

**CHARAKTERISIERUNG EINER MITOCHONDRIAL
VERERBTEN KONDITIONELL
ATMUNGSDEFEKTEN MUTANTE DER
BÄCKERHEFE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

Angela M. Wolf

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551910_0061

Aus dem Genetischen Institut der Universität München

Lehrstuhlinhaber: Prof. Dr. F. Kaudewitz

CHARAKTERISIERUNG EINER MITOCHONDRIAL
VERERBTEN KONDITIONELL ATMUNGSDEFEKTEN
MUTANTE DER BÄCKERHEFE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades des

Fachbereichs Biologie

der Ludwig - Maximilians - Universität München

vorgelegt von

Angela M. Wolf, geb. Handwerker

aus Klingenberg

München 1975



1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Kaudewitz
2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. W. Bandlow

Tag der mündlichen Prüfung: 11. 11. 1975

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von 1971 bis 1974 am Genetischen Institut der Universität München unter Anleitung von Prof. Dr. F. Kaudewitz durchgeführt.

Nach Abschluß dieser Arbeit möchte ich allen herzlich danken, die zu ihrer Entstehung beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. F. Kaudewitz für die großzügige Förderung dieser Arbeit. Herrn Dr. R. J. Schweyen danke ich für seine zahlreichen Ratschläge und Diskussionen. Für ihre Hilfsbereitschaft danke ich auch Frau B. Heinerich und Frau M. Schichtel. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft gilt mein Dank für die finanzielle Förderung dieser Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	1
MATERIAL UND METHODEN	4
ERGEBNISSE	17
I. 1) Induktion und Isolierung temperatursensibel at-	
mungsdefekter Mutanten	17
2) Häufigkeit der temperatursensibel atmungsde-	
fekten Mutanten	18
II. Genetische Charakterisierung zweier nicht men-	
delnd vererbter temperatursensibel atmungsde-	
fekter Mutanten	20
1) Mitotische Segregation	20
2) Tetradenanalyse	21
3) Kreuzung mit ρ^o	22
4) Alleliebeziehung der beiden Mutanten M12/ts-8	
und M12/ts-2	23
III. Induktion der petite- Mutation durch Temperatur-	
erhöhung	25
1) Verhalten der haploiden Ausgangsmutante M12/ts-8	
bei der höheren Temperatur	25
2) Induktion der petite- Mutation unter Bedingungen	
des Wachstumsstillstandes	28
3) Wachstum diploider RD/ts ⁻ -Stämme bei der	
höheren Temperatur und damit verbundene Induk-	
tion der petite-Mutation	29
IV. Genetische Charakterisierung der durch Zucht	
der Mutante M12/ts-8 bei der höheren Tempera-	
tur entstandenen petites	33
1) Komplementation mit ρ^+	33
2) Verlust des RD/ts ⁻ -Markers in ρ^- -Mutanten...	38

V.	Ausmaß der Veränderung der mitochondrialen DNS der Mutante M12/ts-8	40
1)	Revertierbarkeit	40
2)	ω - Typ von Ausgangsstamm und Mutante	43
3)	Vergleich des Grads der Suppressivität in Kreuzungen von Ausgangsstamm und Mutante mit bestimmten ρ_s^- -Stämmen	47
4)	Einfluß der RD/ts $^-$ -Mutation auf die Stabilität eines weiteren mitochondrialen Markers während der Mutagenese mit Ethidiumbromid	48
VI.	Einfluß von Hemmstoffen der mitochondrialen Proteinsynthese auf die ρ^- -Induktion der Mutante M12/ts-8	52
	ZUSAMMENFASSUNG	55
	DISKUSSION	57
	LITERATURVERZEICHNIS	62

EINLEITUNG

Mitochondrien stellen ein teilautonomes genetisches System innerhalb der Zelle dar. Sie besitzen genetische Information, welche in ihrer ringförmigen DNS niedergelegt ist (Schatz et al., 1964) und ein eigenes System zur DNS-Replikation. Das proteinsynthetisierende System der Mitochondrien weist Komponenten auf, welche sich in verschiedener Hinsicht von denen des Cytoplasmas unterscheiden. Viele Ähnlichkeiten mit bakteriellen Systemen lassen es heute als gesichert erscheinen, daß sich Mitochondrien von symbiontischen Bakterien ableiten (Schnepf und Brown, 1971). Der Versuch, eine Genetik der Mitochondrien aufzubauen, wurde an mancherlei Organismen unternommen, wie Aspergillus nidulans (Rowlands und Turner, 1973; Waldron und Roberts, 1973), Neurospora crassa (Preer, jr., 1971), Paramaecium (Beale et al., 1972) und bei Mäusezellkulturen (Bunn et al., 1974). Die Versuche, mit diesen Organismen eine mitochondriale Genetik zu erstellen, waren jedoch wenig erfolgreich, weil oft mitochondriale Mutationen schädliche Einflüsse auf die Lebensfähigkeit besaßen, der Organismus für diese Studien ungeeignet war oder zu wenige mitochondriale Loci gefunden wurden.

Die Bäckerhefe Saccharomyces cerevisiae erwies sich jedoch als äußerst geeignet zum Studium mitochondrialer Genetik. Als schnellwachsender und leicht zu züchtender Organismus wurde sie schon früh in die Reihe der genetischen Forschungsobjekte aufgenommen, so daß heute eine umfangreiche allgemeine Genetik dieses Organismus vorliegt. Im Gegensatz zu Neurospora crassa können Hefezellen ihren Energiebedarf auf zwei alternativen Wegen decken, nämlich über Atmung oder Gärung.

Sie stellen daher ein einzigartiges System für Untersuchungen mitochondrialer Funktionen dar, weil sie ohne funktionsfähige Atmungskette durch alkoholische Gärung überleben können. Daher ist es mög-

lich, Mutanten mit Defekten in mitochondrialen Funktionen, wie Atmung und Phosphorylierung, zu isolieren und zu charakterisieren. Andererseits sind auch Untersuchungen über die Spezifität von Antibiotica für mitochondriale Funktionen sowie die Isolierung von Resistenzmutanten möglich.

Lamb et al. (1968) isolierten Resistenzmutanten gegen Antibiotica, welche die bakterielle Proteinsynthese hemmen, und Wilkie et al. (1967) wiesen nach, daß eine Reihe dieser Mutationen mitochondrial vererbt sind. Resistenzmutanten führten wiederum zu einer genaueren Untersuchung der bereits bekannten ρ^- -Mutation (Ephrussi et al., 1949). Diese Mutanten sind dadurch gekennzeichnet, daß sie zwar auf vergärbarem Substrat wie Glukose wachsen können, nicht jedoch auf unvergärbaren Medien wie Glyzerin, Äthanol oder Laktat. Der petite-Phänotyp dieser ersten ρ^- -Mutanten verschwand bei der Kreuzung mit dem Wildtyp; dieser Typ wurde als ρ^0 oder ρ -neutral bezeichnet. Später stellte sich heraus, daß dieser ρ^- -Typ keine nachweisbare mitochondriale DNS mehr besitzt. Eine andere Serie von petites (Ephrussi et al., 1955) übertrug den petite-Charakter unterschiedlich stark auf die diploiden Nachkommen und wurde als suppressiv bezeichnet. Mounolou et al. (1966) und Carnevali et al. (1966) konnten nachweisen, daß viele dieser petites abnormale DNS besitzen. Linnane et al. (1968) zeigten, daß solche suppressiven petites noch mitochondriale Resistenzgene tragen können, während sie bei ρ^0 -petites verloren gegangen sind.

Hilfreich für die Isolierung zahlreicher petites war neben den klassischen Mutagenen besonders das Trypanozid Ethidiumbromid (EB), welches in geringen Konzentrationen ohne Letalwirkung den teilweisen oder vollständigen Abbau der mitochondrialen DNS hervorruft.

Die Neigung, ihre funktionstüchtigen Mitochondrien und damit ihre mitochondriale DNS zu verlieren, ist bei verschiedenen Hefestämmen

unterschiedlich stark. Es gibt neben extrem stabilen auch solche, welche bereits spontan einen hohen Prozentsatz petite-Mutanten aufweisen. Diese Instabilität des rho-Faktors war besonders deutlich bei kernkodierten Mutationen, welche zur Atmungsdefizienz führten (Sherman, 1963). Viele dieser Mutanten wiesen gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Mutationsrate zu ρ^- auf, manche konnten überhaupt nur im ρ^- -Zustand erhalten werden.

Die Instabilität des rho-Faktors stellt ein genetisches Phänomen dar, welches durch eine Anzahl von Kerngenen und möglicherweise auch von mitochondrialen Determinanten bestimmt ist (Williamson, 1969). Eine Untersuchung über den Prozeß der Entstehung von petite-Mutanten sowie deren Charakterisierung kann mit den oben beschriebenen kernkodierten atmungsdefekten Mutanten nur schwer durchgeführt werden. Die entstehenden petites sind zahlenmäßig nicht häufig genug für eine quantitative biochemische Analyse der Veränderungen der mitochondrialen DNS. Eine Untersuchung über den Ablauf der petite-Entstehung ist ebenfalls unmöglich bei den sehr instabilen atmungsdefekten Mutanten, da diese nur innerhalb von 5 - 10 Generationen nach Sporenbildung im ρ^+ -Zustand vorliegen.

Einen möglichen Weg, Einsicht in den komplizierten Prozeß der ρ^- -Entstehung zu erhalten, stellt die Verwendung konditioneller Mutanten dar, welche den petite-Phänotyp nur unter bestimmten Bedingungen zeigen. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, solche Mutanten zu isolieren, bei denen die Ausprägung der Mutation, welche zur Instabilität des rho-Faktors führt, temperaturabhängig ist. Durch die Schaltbarkeit der Mutation werden gute Bedingungen geschaffen für die Untersuchung der Mechanismen der petite-Entstehung und der dabei ablaufenden Vorgänge z.B. des Verlustes oder der Veränderung der mitochondrialen DNS. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die genetische und physiologische Charakterisierung solcher Mutanten.

MATERIAL UND METHODEN

1. Hefestämme (*Saccharomyces cerevisiae*)

Haploide Stämme:

M12	a	ile5, trp2, ura3 (Kakar)	
1761		his4, trp1, ade2, leu2, lys2, tyr6, gal1 (Seattle stock culture)	
H 243		ade1, lys2, trp1 (Spore von D 243 von F. Sherman)	
1422-4C		his2, try5, ura3, met2, ade1, leu1, lys2, gal1 (Hawthorne)	
IL 778-2B		ura1 (Slonimski)	
IL 187-2D		C ^R , ura1, trp1 (Slonimski)	
S 11-2D		C ^R , ura1	
IL 102-5C		E ^R , ura1, trp1 (Slonimski)	
D5-6C		E ^R , ura1 (Spore von D5)	
IL 126-2A/52		rho ^o , ura1 (Slonimski)	
H 243 EB-1		rho ^o	} mit Ethidiumbromid unter Wachs- tumsbedingungen in den obigen Stämmen induziert
M12 EB-1	a	rho ^o	
M12 EB-2	a	rho ^o	
M12 EB-3	a	rho ^o	
M12/ts-2	a	RD/ts ⁻ , ile5, trp2, ura3	} (mit Nitrosoguanidin in M12 induziert)
M12/ts-8	a	RD/ts ⁻ , ile5, trp2, ura3	
D4-4A		E ^R , RD/ts ⁻ , ura1 (Spore von D4)	
D4-1D	a	E ^R , RD/ts ⁻ , ile5	
D4-3C	a	E ^R , RD/ts ⁻ , ile5	

Diploide Stämme:

D3		aus M12/ts-8 x 1761
D5	E ^R	aus M12/ts-8 x IL 102-5C
D1		RD/ts ⁻ , aus M12/ts-8 x 1761

D2	RD/ts ⁻ , aus M12/ts-8 x 1761
D4	E ^R , RD/ts ⁻ , aus M12/ts-8 x IL 102-5C
D6	RD/ts ⁻ , aus M12/ts-8 x 1761
D7	RD/ts ⁻ , aus M12/ts-8 x 1761

2. Medien

<u>YEP - Glukose:</u>	Hefeextrakt	10 g
	Universalpepton	10 g
	Agar (Difco)	15 g
	Glukose	30 g
	H ₂ O dest.	ad 1 Ltr.
	Glukose wurde nach dem Autoklavieren steril zugegeben.	
<u>YEP - Glyzerin:</u>	wie zuvor, statt Glukose 30 ml Glyzerin	
<u>YEPD:</u>	(differentielles Medium): wie YEP-Glyzerin, aber noch zusätzlich 1 g Glukose	
<u>Minimalagar:</u>	Difco Yeast Nitrogen Base	
	w/o amino-acids	7 g
	Agar (Difco)	15 g
	Glukose	30 g
	H ₂ O dest.	ad 1 Ltr.
	Einzelne Aminosäuren werden nach Bedarf supplementiert.	
<u>Azetatager zur</u>	Na-Azetat	4 g
<u>Sporulation:</u>	Agar (Difco)	15 g
	H ₂ O dest.	ad 1 Ltr.
<u>Erythromycin-Medium:</u>	YEP-Glyzerin	
	Phosphatpuffer 50 mM pH 6,5	
	Erythromycin	4 g/l

Hefeextraktmedium fürFlüssigkulturen:

Stammlösungen:

a) Salze:	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	500 g
	KH_2PO_4	437 g
	K_2HPO_4	62,5 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	250 g
	NaCl	50 g
	$\text{H}_2\text{O dest}$	ad 2 Ltr.
b) Spurenelemente:	H_3BO_4	0,1 %
(getrennt ansetzen)	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,1 %
	KJ	0,1 %
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,5 %
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,7 %
c) Vitaminlösung:	Thiamin-Hydrochlorid	400 mg
	Biotin	2 mg
	Inositol	2 mg
	Pyridoxin-Hydro-	
	chlorid	400 mg
	Ca-Pantothenat	400 mg
	Riboflavin	400 mg
	$\text{H}_2\text{O dest.}$	ad 1 Ltr.
d) CaCl_2 -Lösung:	$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	100 g
	$\text{H}_2\text{O dest.}$	ad 1 Ltr.

Für das Hefeextraktmedium nach Wickerham werden die Stammlösungen wie folgt zusammengegeben:

Salzlösungen a/b)	1000 ml
Vitaminlösung c)	50 ml
CaCl_2 - Lösung d)	50 ml
$\text{H}_2\text{O dest.}$	ad 5 Ltr.

Diese Mischung wird sterilisiert und vor Gebrauch mit Wasser 1 : 10

verdünnt und mit der gewünschten Kohlenstoffquelle versetzt.

Puffer:

Tris-Maleat/NaOH-Puffer, pH 6 0,2 m nach Rauen (1964)

Sörensen-Phosphatpuffer, pH 6,5 0,5 m nach Rauen (1964)

Chemikalien:

Soweit nicht anders angegeben von der Firma Merck Darmstadt.

Helicase: Boehringer, Mannheim

Ethidiumbromid: Serva GmbH, Heidelberg

Erythromycin: Boehringer, Mannheim

Abkürzungen:

Chemikalien:	EB	Ethidiumbromid
	NG	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
	CHX	Cycloheximid
	E	Erythromycin

Paarungstypen:	chromosomal:	α und α
	mitochondrial:	ω^+ und ω^-

Mitochondriale Gene:

E^R	resistent gegen Erythromycin
E^S	sensibel " "
E^O	Verlust dieses Gens
RD/ts ⁻	temperatursensibel atmungsdefekt

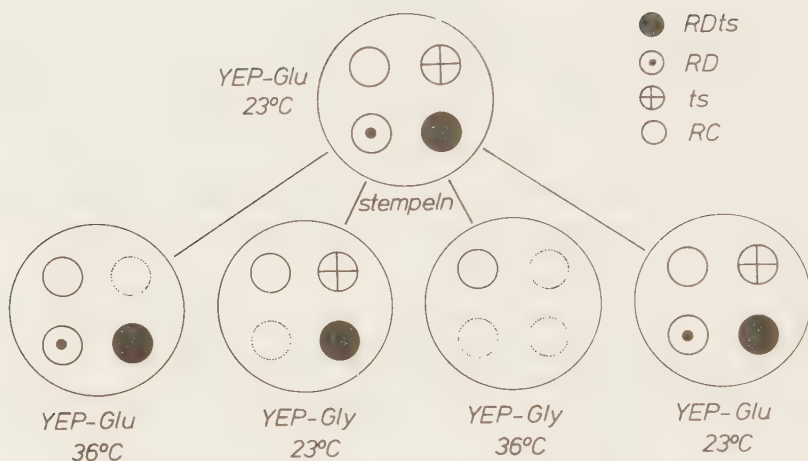
Mutagenese mit N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin = NG

Eine aerob in Hefeextrakt-Glyzerinmedium gewachsene Kultur in der späten logarithmischen Phase (5×10^7 Zellen/ml) wird abzentrifugiert, zweimal mit Tris-Maleinsäurepuffer pH 6,0 gewaschen und in demselben Puffer resuspendiert. Der Titer wird auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. NG wird in einem Mörser pulverisiert und kurz vor Versuchsbeginn in Tris-Maleinsäurepuffer gelöst. (1 mg NG/ml Puffer). 4 ml Zellsuspension werden bei 23°C mit 1 ml NG-Lösung gemischt (Endkonzentration $200 \mu\text{g/ml}$).

Nach 60 Minuten Inkubationsdauer wird die mutagene Behandlung durch Verdünnen mit sterilem H_2O gestoppt. Die Zellen werden abzentrifugiert, zweimal mit H_2O gewaschen und in Hefeextrakt-Glukosemedium aufgenommen, so daß der Titer etwa 5×10^6 Zellen/ml beträgt. Die Zellen werden bei 23°C bis in die frühe stationäre Phase gezüchtet. (Leichte Gasentwicklung in der Kultur zeigt die Gärung der Hefezellen an).

Selektion der temperatursensibel atmungsdefekten Mutanten

Nach der Zwischenbebrütung wird die Zellsuspension verdünnt und etwa 100 Zellen/Platte auf YEP-Glukosemedium ausplattiert. Die Platten werden 4 Tage bei 23°C bebrütet. Nach Koloniewachstum wird jede Platte auf zwei YEP-Glyzerin- und eine YEP-Glukose-Platte gestempelt. Eine YEP-Glyzerin-Platte und die Mutterplatte werden bei 23°C bebrütet. Die zweite YEP-Glyzerin-Platte und die YEP-Glukose-Platte werden bei 36°C bebrütet. Das ist notwendig, da neben den temperatursensibel atmungsdefekten = RD/ts^- Mutanten auch die allgemein temperatursensiblen Mutanten und alle atmungsdefekten Mutanten nicht auf YEP-Glyzerinmedium bei 36°C wachsen. Durch Vergleich des Koloniewachstums auf den drei Stempelplatten können RD/ts^- Mutanten erkannt werden. (Figur 1)



Figur 1

Schematische Darstellung der Isolierung temperatursensibel at-
mungsdefekter Mutanten. (Abkürzungen siehe Seite 8).

Standardkreuzung und mitotische Segregation

Zwei haploide Stämme entgegengesetzten Paarungstyps und komple-
mentierender Auxotrophien werden in flüssigem Hefeextrakt-Glyze-
rinmedium in die stationäre Phase gezüchtet. Zur Kontrolle wird je-
der haploide Stamm auf Minimalagar und auf zwei YEP-Glyzerinplat-
ten ausgetropft. Die Minimalmediumplatte, sowie eine YEP-Glyzerin-
platte werden bei 23°C bebrütet, während die zweite YEP-Glyzerin-
platte bei 36°C bebrütet wird.

Je 0,1 ml Flüssigkultur der beiden Kreuzungspartner werden auf eine

Minimalmediumplatte plattiert, und diese wird bei 23°C bebrütet. Wenn nach 3 - 5 Tagen Bebrütung mehr als 1000 Zygoten gewachsen sind, können die Kreuzungen weitergeführt werden. Die Diploiden werden abgewaschen und in geeigneter Verdünnung (etwa 50 Kolonien/Platte) wieder auf Minimalmedium ausplattiert. Jede diploide Zelle benötigt bis zur Koloniebildung etwa 20 Generationen. In dieser Zeit segregiert die Mitochondrienpopulation. Die Diploiden werden zur Untersuchung von atmungskompetenten, atmungsdefekten und temperatursensibel atmungsdefekten Kolonien auf YEP-Glyzerinplatten gestempelt und entsprechend bebrütet (siehe Abschnitt: Selektion der Mutanten).

Ist ein Kreuzungspartner erythromycinresistent, so enthält das Vorkulturmedium 4 g/l Erythromycin. Die Diploiden solcher Kreuzungen werden entsprechend auch auf YEP-Glyzerinmedium plus Erythromycin gestempelt.

Tetradenanalyse

Diploide Zellen (Gewinnung siehe Abschnitt "Mitotische Segregation") werden in H₂O suspendiert, abzentrifugiert und das Pellet in 0,3 ml H₂O aufgenommen und auf Azetatagar gebracht.

Nach 5 - 6 Tagen Bebrütung bei 23°C bilden sich Asci. Zur Tetradenanalyse wird eine Impföse voll Zellmaterial vom Azetatagar genommen und in 1 ml H₂O suspendiert. Um die Ascuswände zu verdauen wird die Zellsuspension 30 Minuten lang mit 20 µg Helicase inkubiert. Anschließend werden die Zellen gewaschen, abzentrifugiert und in einigen Tropfen H₂O aufgenommen. Von dieser Suspension wird jeweils ein Tropfen auf eine YEP-Glukoseplatte ausgestrichen. Die Sporen werden mit Hilfe des Mikromanipulators aus der angedauten Ascushülle befreit und in bestimmten Abständen auf der Platte ausgelegt. Nach 4 - 6 Tagen haben die keimfähigen Sporen Kolonien gebildet. Diese werden jetzt auf selektive Medien gestempelt.

Kreuzung mit ρ^0 -Stämmen

Die Mutante und ein ρ^- -Stamm, der sich in Kreuzungen mit ρ^+ als ρ^- neutral verhält, werden diploidisiert. (siehe Abschnitt "Mitotische Segregation") Die Diploiden werden auf den RD/ ts^- - Marker getestet.

Wachstumskurven

Die zu untersuchenden Stämme werden in flüssigem Hefeextrakt-Glyzerinmedium bis in die stationäre Phase vorgezüchtet und anschließend entweder in dasselbe Medium oder in Hefeextrakt-Glukosemedium überimpft. Der Ausgangstiter beträgt etwa 5×10^5 Zellen/ml. Diese Kulturen werden bei 23°C oder bei 36°C geschüttelt. Zu bestimmten Zeiten werden Proben entnommen, der Titer durch Zählen mit Hilfe eines Hämatocytometers bestimmt und die Zellen in geeigneter Dichte auf YEP-Glukosemedium ausplattiert. Die Platten werden bei 23°C bebrütet.

Nach 3 - 5 Tagen gewachsene Kolonien werden ausgezählt und somit die Anzahl der koloniebildenden Zellen bestimmt. Dieser Wert wird für die Wachstumskurven verwendet.

Bestimmung des Prozentsatzes an ρ^- - Zellen unter Wachstumsbedingungen.

Alle Platten, die zur Titerbestimmung für die Wachstumskurven plattiert wurden, werden nach Koloniewachstum auf YEP-Glyzerinmedium gestempelt, bei 23°C bebrütet und der Anteil der ρ^- -Kolonien bestimmt. Sektorierte Kolonien werden als ρ^+ gewertet.

Mutagenese mit Ethidiumbromid unter Bedingungen des Wachstumsstillstandes (Bolotin et al., 1971)

Stammlösungen und Zellmaterial:

Ethidiumbromid	20 µg/ml	(filtersteril)
Sörensenpuffer	0,5 M, pH 6,5	(autoklaviert)

Die zu untersuchenden Stämme werden in Hefeextrakt-Glyzerinmedium bis in die stationäre Phase vorgezüchtet, abzentrifugiert, zweimal mit H₂O gewaschen und in Sörensenpuffer 0,05 M pH 6,5 zu einem Titer von 10⁷ Zellen/ml aufgenommen. Diese Zellsuspension wird 24 Stunden lang bei 23°C ausgehungert.

Versuchsansatz:

	ml	Endkonzentration
Wasser	3,5	
Ethidiumbromid	0,5	2 µg/ml
Sörensenpuffer	0,5	0,05 M
Zellsuspension	0,5	10 ⁶ Zellen/ml

Durchführung:

Diese Mischung wird bei 23°C geschüttelt. Zu den angegebenen Zeiten werden Proben entnommen und auf YEPD ausplattiert. Auf diesem Medium erreichen atmungskompetente Kolonien ihre normale Größe, während atmungsdefekte Kolonien wegen Glukosemangels nur zu winzigen, durchscheinenden Kolonien heranwachsen können. Auf Grund ihrer Koloniegröße kann zwischen atmungskompetenten Kolonien und atmungsdefekten Kolonien leicht unterschieden werden.

Cross-replica Technik zur Bestimmung des E^R-Markers in cytoplasmatisch atmungsdefekten Mutanten.

Erythromyzin hemmt das Wachstum von Saccharomyces cerevisiae nur, wenn dieser Organismus mit einem nichtvergärbaren Substrat, wie

z.B. Glycerin, gezüchtet wird (Clark-Walker und Linnane, 1966; Williamson et al., 1971). Petite-Mutanten, die auf ihrem mitochondrialen Genom möglicherweise noch die Resistenz gegen dieses Antibioticum tragen, können nicht direkt auf diese Eigenschaft hin getestet werden, da sie mit Glycerin als C-Quelle nicht wachsen können. Diploidisiert man solche ρ^- -Mutanten mit sensiblen ρ^+ -Stämmen, so finden sich unter den diploiden Segreganten atmungskompetente E^R -Kolonien. Die E-Resistenz kann aber nur vom ρ^- -Partner kommen, da der ρ^+ -Partner sensibel war. Der Anteil an atmungsdefekten Diploiden bei Kreuzungen $\rho^+ \times \rho^-$ schwankt je nach Suppressivität des ρ^- -Partners. Aus diesem Grund erhält man für verschiedene Kreuzungen, bei denen der ρ^- -Partner noch die E-Resistenz trug, unterschiedliche Ausbeuten an $\rho^+ E^R$ -Diploiden.

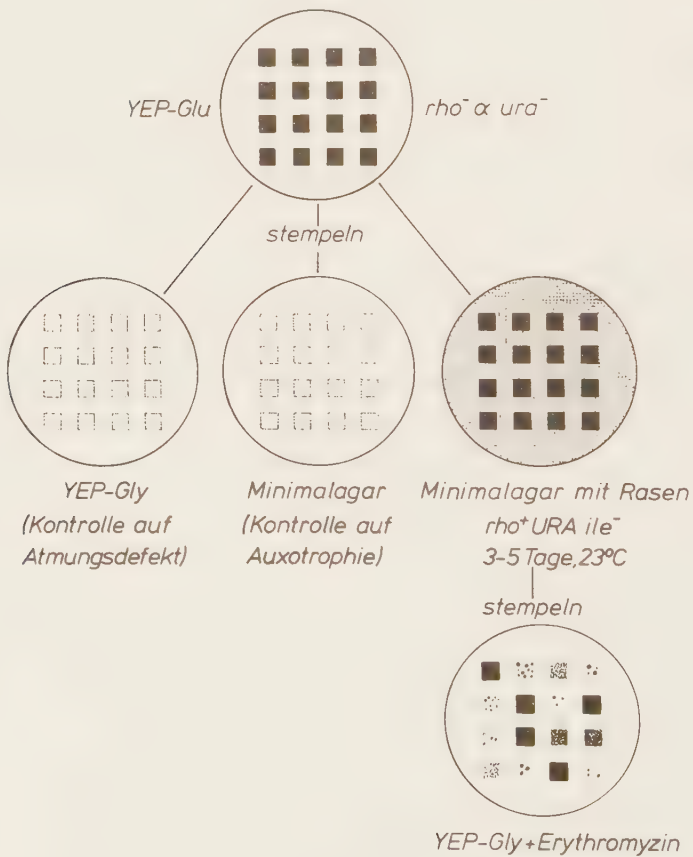
Nach Mutagenese mit Ethidiumbromid erhaltene ρ^- -Kolonien werden mit einer Impföse abisoliert und in Form kleiner Quadrate (Flächeninhalt etwa 1 cm^2) auf YEP-Glukosemedium ausgestrichen. Die Platten werden 3 Tage bei 23°C bebrütet. Die ρ^- -Stämme bilden in dieser Zeit kleine Rasen, von denen jeder zwischen 10^7 und 10^8 Zellen beinhaltet. Zur Kreuzung plattiert man etwa 10^7 Zellen eines haploiden, erythromyzinsensiblen, atmungskompetenten Stammes entgegengesetzten Paarungstyps und komplementierender Auxotrophien auf eine Minimalmediumplatte. Jetzt werden die Platten mit den ρ^- -Stämmen zuerst auf eine YEP-Glycerinplatte und eine Minimalmediumplatte (diese Platten dienen der Kontrolle) und dann auf die Platte mit dem frisch plattierten Rasen des Kreuzungspartners gestempelt. Nach 3 - 5 Tagen haben sich Diploide gebildet. Die Diploiden werden auf Erythromyzinmedium gestempelt. Trugen die getesteten ρ^- -Mutanten noch die Information für Erythromyzinresistenz auf ihrem mitochondrialen Genom, so wachsen auf Erythromyzinmedium Kolonien heran. Je nach Anteil an atmungskompetenten erythromyzin-

resistenten Diploiden bildet sich auf Erythromylinmedium pro Stem-
 pelabdruck entweder ein Rasen, oder es wachsen nur wenige erythro-
 mylinresistente Kolonien heran. Wurden pro ρ^- -Mutante mehr als
 10 Kolonien auf Erythromylinmedium gezählt, so wurde sie zu den
 erythromylinresistenten ρ^- -Mutanten = $\rho^- E^R$ gerechnet.
 (Fig. 2)

Figur 2

Schematische Darstellung der cross-replica Technik zur Bestimmung der mitochondrial kodierten genetischen Information zur Antibiotika-Resistenz in ρ^- Zellen.

(Abkürzungen siehe Seite 8)



ERGEBNISSE

I) Induktion und Isolierung temperatursensibel atmungsdefekter Mutanten.

1.) Stamm und Mutagen

Untersuchungen an Saccharomyces cerevisiae, die Mutationen mitochondrialer Funktionen betreffen, werden oft durch die hohe Spontanmutationsrate zu ρ^- vieler Stämme erschwert. Um solche Schwierigkeiten möglichst zu vermeiden, wurde die Mutationsinduktion an Zellen des Stammes M12 vorgenommen, welcher eine äußerst niedrige Spontanmutationsrate zu ρ^- besitzt. Sie liegt bei 0,05 % (Bachofen et al., 1972).

Als Mutagen wurde N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin, ein alkylierendes Agens gewählt. Mit NG können nicht nur karyotische, sondern auch extrakaryotische Mutanten induziert werden (Nordström, 1967).

Zellen des Stammes M12 wurden mit NG, wie unter Material und Methoden beschrieben, behandelt. Nach einer Inkubationsdauer von 60 Minuten fanden sich noch etwa 5 % Überlebende in den Kulturen. Die folgende Zwischenbebrütung während einiger Generationen sollte nicht nur mutierten Kernallelen, sondern auch mitochondrialen Allelen die Segregation ermöglichen. Stevens (Vortrag beim 7. Internationalen Kongreß für Hefegenetik und molekulare Biologie, Brighton, 1974) fand durch Auswertung von Serienschnitten eine mittlere Anzahl von 5 Mitochondrien pro Hefezelle bei Saccharomyces cerevisiae. Nimmt man an, daß nur ein mitochondriales DNS-Molekül mutiert wird, so können frühestens nach mehreren Generationen im mitochondrialen Genom reinerbige Klone auftreten.

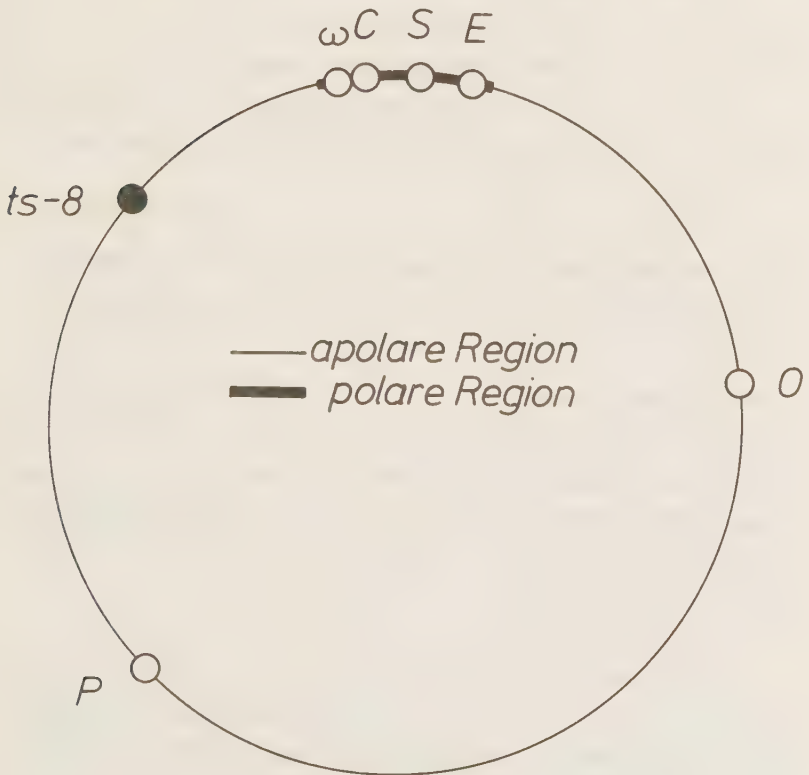
2.) Häufigkeit der temperatursensibel atmungsdefekten Mutanten.

Von den Nachkommen der mutagen behandelten Zellen erwiesen sich etwa 1 bis 2 % als temperatursensibel. Sie konnten bei 23°C, nicht aber bei 36°C wachsen, gleichgültig ob vergärbare oder nichtvergärbare Substrat als Kohlenstoffquelle geboten wurde. Solche Mutanten wurden von Hartwell (1967) ausführlich beschrieben. Etwa 0,2% der Überlebenden war temperatursensibel atmungsdefekt. Diese Mutanten können bei 36°C auf vergärbarem Substrat wachsen, nicht aber auf unvergärbarem Substrat wie z.B. Glyzerin. Brachte man solche temperatursensibel atmungsdefekte Mutanten nach längerem Wachstum in Hefeextrakt-Glukose-Medium bei 36°C zurück auf 23°C, so waren sie wieder atmungskompetent. Bei diesen 0,2% ist die Atmungsdefizienz temperaturabhängig, aber voll reversibel. Nur bei etwa jeder 10. atmungsdefekt temperatursensiblen Mutante fanden sich nach längerem Wachstum in Hefeextrakt-Glukose-Medium bei 36°C nicht mehr ausschließlich atmungskompetente Zellen. Je nachdem wieviele Generationen bei der höheren Temperatur durchlaufen wurden, enthielt die Population mehr oder weniger atmungsdefekte Zellen, die auch bei 23°C atmungsdefekt bleiben. Das bedeutet, daß die Zellen während des Wachstums in Hefeextrakt-Glukose-Medium bei der höheren Temperatur atmungsdefekt wurden. Solche Mutanten sollen hier zur Unterscheidung von den oben erwähnten Typen irreversibel temperatursensibel atmungsdefekt genannt werden. Nur dieser Mutantentyp sollte näher charakterisiert werden. Etwa fünf verschiedene Versuchsansätze brachten eine ähnliche Verteilung der beschriebenen Mutantentypen. Bei jeder Inkubation mit NG wurden 1 bis $2 \cdot 10^4$ Kolonien getestet, unter rund 10^5 getesteten Kolonien fanden sich also nur 0,02% irreversibel temperatursensibel atmungsdefekte Mutanten. Alle diese Mutanten waren chromosomal vererbt. Tetradenanalysen ergaben eindeutige 2:2 Aufspaltung des RD/15⁻

Markers (Schweyen und Heinerich, pers. Mitteilung). Nur bei einem Versuchsansatz fanden sich neben chromosomal vererbten irreversiblen RD/ts^- Mutanten zwei, die nicht diese eindeutige 2:2 Aufspaltung in der Tetradenanalyse zeigten. Diese beiden Mutanten werden im Folgenden beschrieben.

Figur 3

Karte des mitochondrialen Genoms von *Saccharomyces cerevisiae*



II) Genetische Charakterisierung zweier nicht mendelnd vererbter temperatursensibel atmungsdefekter Mutanten

Liegt der Verdacht vor, daß eine Mutation nicht mendelnd vererbt wird, so gibt es mehrere Möglichkeiten, einen extrakaryotischen Erbgang nachzuweisen. Nach Bolotin et al. charakterisieren 2 Regeln eine extrakaryotische Mutation.

- a) Während der mitotischen Vermehrung einer mitochondrial gemischterbigen Zygote kommt es zur Segregation des betreffenden Markers (Mitotische Segregation mitochondrialer Marker). Darunter versteht man folgende Erscheinung: Diploidisiert man einen resistenten haploiden Stamm mit einem sensiblen Stamm entgegengesetzten Paarungstyps, so findet man unter den Nachkommen sowohl resistente als auch sensible Diploide.
- b) Während der Meiose erscheinen keine Segreganten, alle Tetraden spalten 0 : 4 oder 4 : 0, wenn die mitotische Segregation der Zygote nach a) zuvor vollständig abgelaufen war.

Um zu prüfen, ob eine Mutation in der mitochondrialen DNS liegt, diploidisiert man die betreffende Mutante mit einem Stamm, der keine nachweisbare mitochondriale DNS mehr besitzt. Die Diploiden müssen im Falle einer mitochondrialen Mutation alle den Mutantenphänotyp zeigen.

1.) Mitotische Segregation

Zur Untersuchung der mitotischen Segregation wurden die Mutanten M12/ts-2 und M12/ts-8 mit atmungskompetenten Stämmen diploidisiert und die diploiden Nachkommen getestet. Das Ergebnis ist in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1

Mitotische Segregation der temperatursensibel atmungsdefekten Mutationen in Kreuzungen mit ρho^+ -Stämmen

Kreuzung	getestete Diploide	%RC	%RD/ts ⁻	%RD
M12/ts-8 a ω^- x H243 α ω^-	741	59	39	2
M12/ts-2 a ω^- x H243 α ω^-	439	57	41	2
M12 RC a ω^- x H243 α ω^-	185	98	0	2
M12/ts-8 a ω^- x 1761 α ω^-	401	62	37	1
M12/ts-2 a ω^- x 1761 α ω^-	802	64	35	1
M12 RC a ω^- x 1761 α ω^-	230	99	0	1
M12/ts-8 a ω^- x IL 778-2B α ω^-	267	52	48	3

2.) Tetradenanalyse

Extrakaryotische Mutationen sind dadurch charakterisiert, daß bei der Sporulation von Diploiden alle Nachkommen den Phänotyp eines Elternstammes zeigen. Bei diesem Vererbungsmodus sollten entweder alle Sporen einer Tetrade RD/ts⁻ oder RC sein. Tetraden mit ausschließlich RD/ts⁻-Sporen treten auf, wenn die sporulierte Diploide RD/ts⁻ war, umgekehrt entstehen aus atmungskompetenten Diploiden ausschließlich atmungskompetente Sporen. Zur Kontrolle verfolgt man die Aufspaltung der karyotisch vererbten Auxotrophien, die bei einer vollständigen Tetrade im Verhältnis 2 : 2 auftreten müssen. Zur Tetradenanalyse wurden die Mutanten M12/ts-8 (a) bzw. M12/ts-2 (a) mit atmungskompetenten Stämmen (α) diploidisiert. Die Diploiden wurden sporuliert und die Meiosporen analysiert. Das Ergebnis ist in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2

Tetradenanalyse

Diploide	Anzahl der analysierten Tetraden			
	4 Spo- ren	: RC:RD/ts ⁻	3 Spo- ren	RC:RD/ts ⁻
M12/ts-8 a x H 243 α	6	4 : 0	30	3 : 0
M12/ts-2 a x H 243 α	6	4 : 0	23	3 : 0
M12/ts-8 a x 1422-4c α	5	4 : 0	30	3 : 0
M12/ts-2 a x 1422-4c α	12	4 : 0	38	3 : 0

3.) Kreuzung mit rho^o

Um zu prüfen, ob die extrakaryotische Mutation in der mitochondrialen DNS lokalisiert ist, wurden die RD/ts⁻-Mutanten mit Stamm IL 126-2A/52 C^oE^oO^o, der keine nachweisbare mitochondriale DNS mehr besitzt (Slonimski, pers. Mitteilung) und mit einer petite-Mutante des Stammes H 243 diploidisiert. Der Stamm H 243 (siehe mitotische Segregation) wurde unter Wachstumsbedingungen mit höheren Ethidiumbromidkonzentrationen (200 μ g) behandelt, bis die Population quantitativ rho⁻ war. Bei diesen Konzentrationen erhält man mit größter Wahrscheinlichkeit ausschließlich rho^o-Zellen (Slonimski, 1968). Nach weiterem Wachstum (etwa 100 Generationen) der rho⁻-Zellen in vergärbarem Substrat wurde die rho⁻-Mutante H 243 EB-1 abisoliert. Da sich diese Mutante in Kreuzungen mit atemungskompetenten Stämmen neutral verhält, ist es wahrscheinlich, daß sie ebenfalls rho^o ist (Nagley und Linnane, 1972). Die Diploiden der Kreuzungen RD/ts⁻ x rho^o erwiesen sich als RD/ts⁻ (Tabelle 3). Da der rho^o-Kreuzungspartner keine mitochondriale genetische Information mehr besaß, kann in den Diploiden nur die genetische Information, die auf der mitochondrialen DNS der RD/ts⁻-Mutante lokalisiert ist, zur phänotypischen Ausprägung kommen.

Tabelle 3

Mitotische Segregation der temperatursensibel atmungsdefekten Mutationen in Kreuzungen mit ρ^0 Stämmen

Kreuzung	%RC	%RD/ts ⁻	%RD
M12/ts-8 a x IL 126-2A/52 α	0	96	4
M12/ts-2 a x IL 126-2A/52 α	0	95	5
M12 RC a x IL 126-2A/52 α	99,5	0	0,5
M12/ts-8 a x H 243 EB-1 α	0	97	3
M12/ts-2 a x H 243 EB-1 α	0	96	4
M12 RC a x H 243 EB-1 α	100	0	0

4.) Alleliebeziehungen der beiden Mutanten M12/ts-2 und M12/ts-8

Um festzustellen, ob es sich bei den Mutanten M12/ts-8 und M12/ts-2 um Homoallele oder Heteroallele handelt, wurde die Mutante M12/ts-8 (a RD/ts⁻, ile5, trp2, ura3) mit der auxotrophen Mutante IL 102-5C (α E^R, trp1, ura1) gekreuzt und eine Spore D4-4A (α E^R, RD/ts⁻, ura1) selektiert. Diese Spore wurde mit der Mutante M12/ts-2 gekreuzt; unter 600 diploiden Nachkommen fand sich keine Wildtyprekombinante. (Tabelle 4). Solche Kreuzungsanalysen sind zwangsläufig durch die Menge der zu untersuchenden Diploiden limitiert. Es kann daher keine endgültige Entscheidung getroffen werden, ob es sich um zwei eng benachbarte Heteroallele oder um Homoallele handelt. Da beide Mutanten aus derselben Mutationsinduktion stammen, ist es durchaus möglich, daß sie identisch sind.

Im folgenden werden M12/ts-2 und M12/ts-8 als identisch angesehen und physiologische und genetische Daten für beide Mutanten zusammengefaßt, zumal sich beide auch bezüglich ihrer physiologischen Eigenschaften als identisch erwiesen.

Tabelle 4

Kreuzung der beiden Mutanten M12/ts-2 und M12/ts-8

Kreuzung	Parentaltypen		Rekombinantentypen (wenn M12/ts-2 von M12/ts-8 unterschieden werden kann)
	RD/ts ₁ ⁻ E ^S von M12/ts-2	RD/ts ₂ ⁻ E ^R von M12/ts-8	
M12/ts-2 a RD/ts ₁ ⁻ x D4-4A RD/ts ₂ ⁻ E ^R	204 (33%)	420 (67%)	0
	RC,E ^S	RD/ts ₂ ⁻ E ^R	RDts ₂ ⁻ E ^S
M12 a RC x D4-4A RD/ts ₁ ⁻ E ^R	106 (47%)	72 (33%)	27 (12%) 18 (8%)

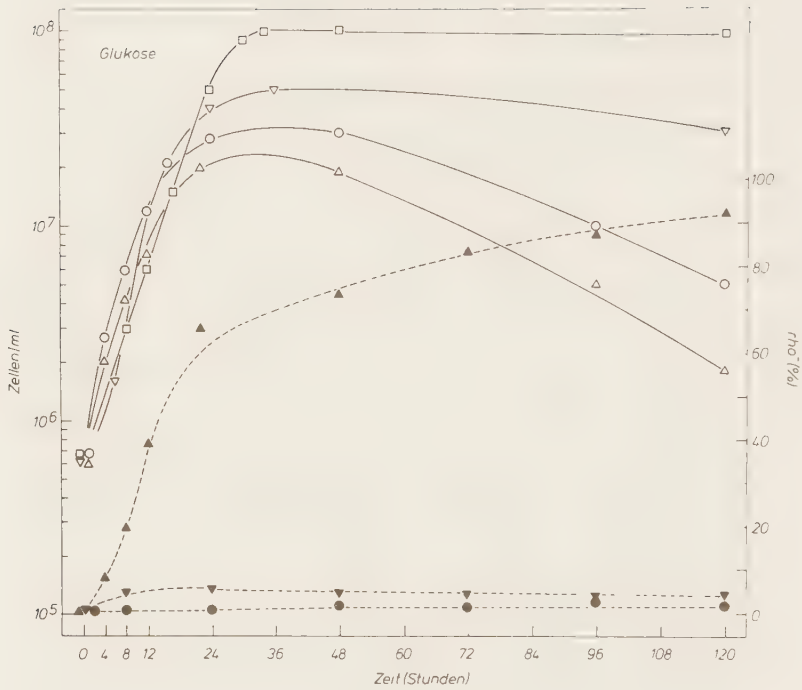
III) Induktion der petite-Mutation durch Temperaturerhöhung

1.) Verhalten der haploiden Ausgangsmutante M12/ts-8 bei der höheren Temperatur

a) in Hefeextrakt-Glukose-Medium

Der Wildtyp und die Mutante M12/ts-8 erreichen die stationäre Phase bei 36°C mit niedrigerem Titer als bei 23°C (Figur 1). War die Mutante etwa 12 Stunden bei 36°C gewachsen, so verlängerte sich bereits die Generationsdauer. Zu diesem Zeitpunkt enthielt die Kultur etwa 40% rho⁻-Zellen. Schon bei einem Titer von $1 - 2 \times 10^7$ Zellen/ml war die Mutante nach Wachstum bei 36°C in ihrer stationären Phase angelangt. Wurde die Kultur jetzt bei 36°C weiter geschüttelt, so nahm die Anzahl der zur Koloniebildung fähigen Zellen ab (Figur 4). Obwohl nach 48 Stunden Wachstum bei 36°C keine Zunahme des Zelltiters sondern eine Abnahme zu beobachten war, nahm der Prozentsatz der rho⁻-Zellen in der Population weiter zu. Diese Beobachtung besagt nicht notwendigerweise, daß die atemungskompetenten Mutterzellen selbst atemungsdefekt werden. Die beobachteten rho⁻-Zellen können auch bei weiteren Zellteilungen während der stationären Phase heraussegregiert sein. Diese Möglichkeit würde auch mit dem Befund übereinstimmen, daß in der Zeit der häufigen Zellteilung (log-Phase) der Prozentsatz an rho⁻-Zellen in der Population rasch zunimmt, in der Zeit der selteneren Zellteilungen (stationäre Phase) dagegen nur langsam steigt.

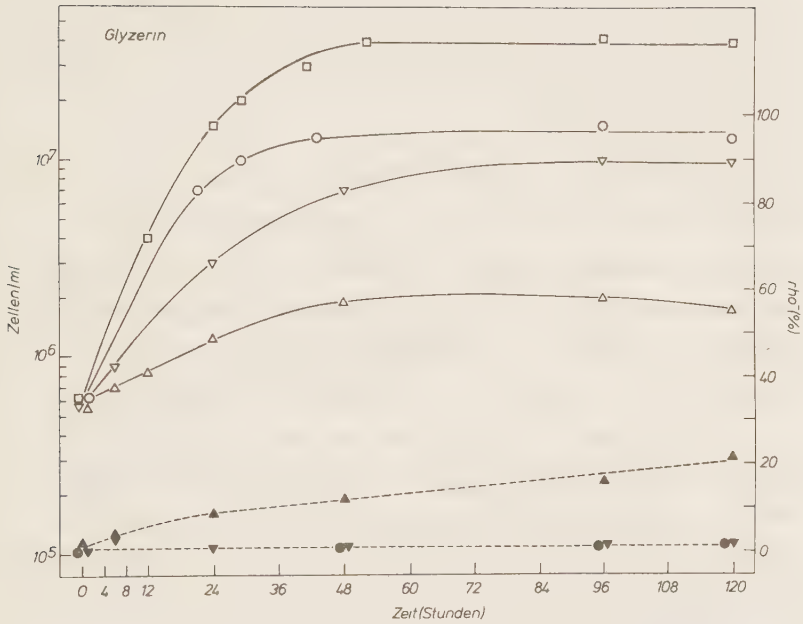
Um in kürzerer Zeit annähernd 100% rho⁻-Zellen zu erhalten, wurden bei 36°C geschüttelte Zellen der Mutante nach 12 bis 24 Stunden Wachstum in Hefeextrakt-Glukose-Medium in frisches, vorgewärmtes Medium überimpft.



Figur 4

Temperaturabhängige Induktion der petite-Mutation während des Wachstums der Mutante M12/ts-8 in Hefeextrakt-Glukose-Medium bei 36°C

- Wachstum des Wildtyps M12 bei 36°C
- " " " " " 23°C
- △ " der Mutante M12/ts-8 bei 36°C
- ▽ " " " " " 23°C
- % rho⁻-Zellen im Stamm M12 (Wildtyp) nach Wachstum bei 36°C
- ▲ " " " " M12/ts-8 " " " "
- ▼ " " " " " " " " 23°C



Figur 5

Temperaturabhängige Induktion der petite-Mutation während des Wachstums der Mutante M12/ts-8 in Hefeextrakt-Glycerin-Medium bei 36°C. Zeichenerklärung wie in Figur 4.

Nach etwa zwei weitere Generationen umfassendem Wachstum bei 36°C fanden sich fast ausschließlich ρ^- -Zellen in der Kultur. Bestimmt man auf diese Weise den Prozentsatz an ρ^- -Zellen in Abhängigkeit von der Generationsdauer bei 36°C, so ergibt sich Figur 6. Beim Wildtyp fand sich nach Wachstum in Hefeextrakt-Glukose-Medium bei 36°C keine signifikante Zunahme an ρ^- -Zellen (Figur 4).

b) in Hefeextrakt-Glyzerin-Medium

Der Stamm M12 wächst mit Glyzerin als Energiequelle mit etwa dreifacher Generationsdauer verglichen mit Wachstum in Glukose. Die stationäre Phase wird bei einem relativ niedrigen Titer erreicht; das trifft für das Wachstum bei 36°C und bei 23°C zu (Figur 5). Auch die Mutante wuchs bei 23°C in Hefeextrakt-Glyzerin-Medium sehr langsam und war bereits bei etwa 10^7 Zellen/ml in ihrer stationären Phase angelangt. Bei 36°C verdoppelten sich die Zellen ein bis zweimal, dann blieb die Zahl der koloniebildenden Zellen gleich und nahm nicht wie beim Wachstum in Hefeextrakt-Glukose-Medium bei 36°C ab. Die Anzahl der ρ^- -Zellen in der Population stieg auch in Hefeextrakt-Glyzerin-Medium etwas an, erreichte aber auch nach 5 Tagen höchstens 20%. Diese Tatsache, sowie die Wachstumskurve mit Induktionskurve der petite-Mutation durch Temperaturerhöhung deuten darauf hin, daß die Induktion der petite-Mutation nur unter Wachstumsbedingungen stattfinden kann (Figur 5).

2.) Induktion der petite-Mutation unter Bedingungen des Wachstumsstillstandes

Stationäre Zellen von Wildtyp und Mutante wurden abzentrifugiert, zweimal gewaschen und in Puffer aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde fünf Tage bei 36°C geschüttelt. In dieser Zeit blieb der Prozentsatz an ρ^- -Zellen in beiden Fällen konstant,

Erst nach 10 Tagen Schütteln in Puffer bei der höheren Temperatur stieg der Anteil an ρ^- -Zellen etwas an, er blieb jedoch unter 10%. Da dieses Phänomen bei Mutante und Wildtyp sowohl bei 36°C als auch bei 23°C auftritt, scheint es sich um eine Folge des Aushungerns zu handeln. Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, daß bei dieser Mutante die Induktion der petite-Mutation durch höhere Temperatur nur unter Wachstumsbedingungen erfolgen kann. Im Gegensatz hierzu ist eine Induktion der petite-Mutation auch unter Bedingungen des Wachstumsstillstandes möglich. Ethidiumbromid kann auch unter diesen Bedingungen, allerdings bedeutend weniger effektiv als unter Wachstumsbedingungen, durch Zerstörung der mitochondrialen DNS atmungskompetente Zellen zu ρ^- -Zellen mutieren (Slonimski et al., 1966).

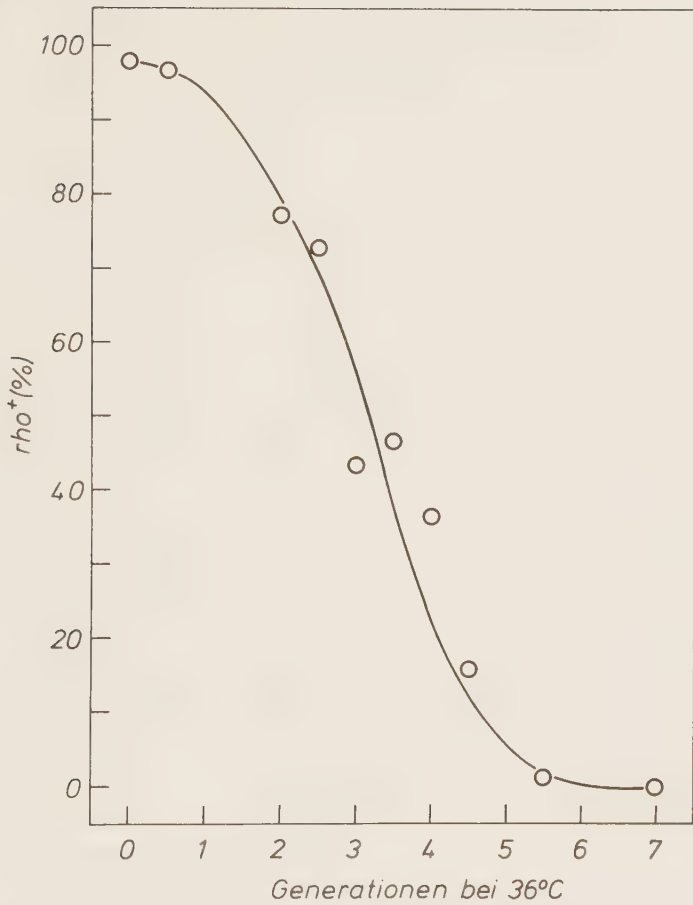
3.) Wachstum diploider RD/ts⁻-Stämme bei der höheren Temperatur und damit verbundene Induktion der petite-Mutation

Zwei diploide Segreganten aus der Kreuzung M12/ts-8 x 1761, die sich als temperatursensibel atmungsdefekt erwiesen, wurden ebenfalls in Hefeextrakt-Glukose-Medium bei 23°C und bei 36°C geschüttelt. Dabei fällt auf, daß der Prozentsatz an ρ^- -Zellen langsamer steigt als bei der haploiden Ausgangsmutante (Figur 7).

Die langsamere Induktion der petite-Mutation durch höhere Temperatur bei diploiden temperatursensibel atmungsdefekten Stämmen ist möglicherweise durch die neuen Kerngene der Diploiden beeinflusst (Slonimski, pers. Mitteilung). Andererseits könnte auch eine größere Anzahl von mitochondrialen DNS-Molekülen für die langsamere petite-Entstehung verantwortlich sein.

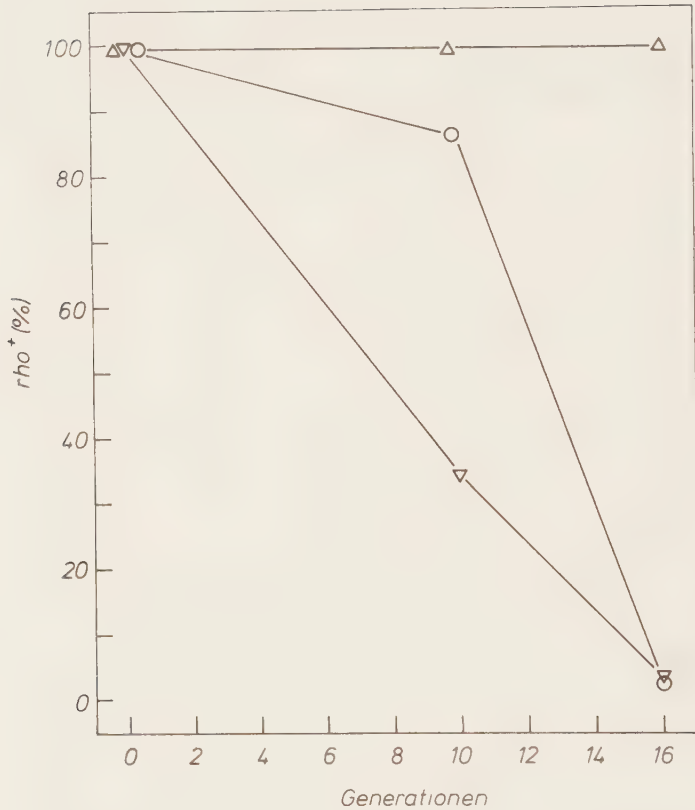
Nach Williamson (1970) besitzen diploide Zellen mehr mitochondriale DNS als haploide. Wenn nun Induktion der petite-Muta-

tion unter Wachstumsbedingungen stattfindet, wird während des Wachstums bei der höheren Temperatur keine intakte mitochondriale DNS mehr gebildet. Noch vorhandene unversehrte mitochondriale DNS-Moleküle werden während des Wachstums bei der höheren Temperatur herausverdünnt.



Figur 6

Induktion der petite-Mutation während des Wachstums der Mutante M12/ts-8 bei 36°C in Hefeextrakt-Glukose-Medium in Abhängigkeit von der Generationsdauer.



Figur 7

Induktion der petite-Mutation während des Wachstums der temperatur-sensibel atmungsdefekten Diploiden D1 und D2 bei 36°C in Hefeextrakt-Glukose-Medium in Abhängigkeit von der Generationsdauer.

Zeichenerklärung:

∇ D 1 RD/ts ⁻ $\circ$ D 2 RD/ts ⁻ Δ D 3 RC	}	Diploide der Kreuzung M12/ts-8 x 1761
--	---	---------------------------------------

IV. Genetische Charakterisierung der durch Zucht der Mutante M12/ts-8 bei der höheren Temperatur entstandenen petites.

Extrakaryotisch vererbte petite-Mutanten bzw. ρ^- -Mutanten lassen sich nach dem Grad ihrer Suppressivität einteilen (Ephrussi et al., 1955, 1966; Ephrussi und Grandchamp, 1965). Eine ρ^- suppressiv-Mutante (ρ_s^-) kann ihren petite-Charakter nach Diploidisierung mit atmungskompetenten Stämmen auf die Zygoten übertragen. Dabei wird die Häufigkeit der resultierenden ρ^- -Zygoten als Grad der Suppressivität bezeichnet. ρ^- neutral (ρ_n^-) Mutanten dagegen vermögen ihren petite-Phänotyp nicht auf die Nachkommenschaft zu übertragen. Ihr Grad an Suppressivität ist demnach gleich Null. Die Mutation zu ρ_n^- oder ρ_s^- wird durch Änderungen der mitochondrialen DNS verursacht. Bei ρ_n^- -Mutanten kann keine mitochondriale DNS mehr nachgewiesen werden; daher werden sie auch als ρ^0 bezeichnet (Nagley und Linnane, 1970; Bernardi et al., 1970; Hollenberg et al., 1970; Saunders et al., 1971; Michaelis et al., 1971; Nagley und Linnane, 1972). ρ_s^- -Stämme besitzen noch mitochondriale DNS und können sogar noch mitochondrial vererbte Resistenzen tragen (Gingold et al., 1969; Coen et al., 1970). Der Grad an Suppressivität wird nicht ausschließlich durch die petite-Mutation selbst bestimmt. Je nach Kreuzungspartner schwankt er für dieselbe ρ_s^- -Mutante (Michaelis et al., 1971). Offensichtlich spielt dabei das mitochondriale und möglicherweise auch das veränderte Kerngenom in der Diploiden eine Rolle.

1.) Komplementation mit ρ^+

Im folgenden sollte festgestellt werden, ob es sich bei den ρ^- -Mutanten, die während des Wachstums der Mutante M12/ts-8 bei der höheren Temperatur entstanden sind, um ρ_s^- oder ρ_n^-

Mutanten handelt. Ist bei der Mutante M12/ts-8 in erster Linie die mitochondriale DNS-Synthese gestört, so sollten bei der höheren Temperatur nach einem relativ kurzen Zeitraum nur noch ρ^0 -Zellen gebildet werden. Die nach Züchtung der Mutante M12/ts-8 bei der höheren Temperatur entstandenen ρ^- -Zellen müssen also mit atmungskompetenten Stämmen diploidisiert und der Anteil atmungsdefekter Zygoten bestimmt und der Grad der Suppressivität errechnet werden. Für diese Kreuzungen wurden einzelne ρ^- -Kolonien von den Platten abisoliert, die zur Bestimmung des Prozentsatzes an ρ^- -Zellen unter Wachstumsbedingungen dienten.

Die Untersuchungen der ρ^- -Zellen, die durch Züchtung der Mutante bei der höheren Temperatur entstanden sind, zeigten, daß nach 3 Tagen Wachstum der Mutante M12/ts-8 bei 36°C von 18 getesteten ρ^- -Kolonien sich alle als ρ_s^- erwiesen und daß selbst nach 9 Tagen Wachstum der Mutante bei 36°C fast ausschließlich ρ_s^- -Zellen gebildet werden. (Tabellen 5 und 6). Dieses Ergebnis zeigt, daß bei dieser Mutante der primäre Effekt beim Übergang zur höheren Temperatur nicht in der Blockierung der mitochondrialen DNS-Synthese liegt.

Kontrollkreuzungen

Der Stamm M12 wurde unter Wachstumsbedingungen mit EB ($10\text{ }\mu\text{g/ml}$) behandelt. Nach etwa 40 Generationen langem Wachstum in Gegenwart von EB wurden Zellen ausplattiert und nach Koloniewachstum 3 ρ^- -Stämme abisoliert. Sie erwiesen sich in allen Kreuzungen als neutral, deshalb können sie als ρ^0 bezeichnet werden. Zur Kontrolle wurden die ρ^0 -Stämme mit den im folgenden verwendeten RC-Stämmen diploidisiert und von den resultierenden Diploiden der Prozentsatz atmungsdefekter Kolonien bestimmt. (Es wurden mindestens 1000 Diploide je Kreuzung getestet).

α	1761	1422-4c	H 243
a	%RD	%RD	%RD
M12/EB1	0	0	8
M12/EB2	0	1,5	8
M12/EB3	0	1,4	-

Entsprechend dieser Kontrollkreuzungen mit ρ° -Stämmen wurden bei den zu testenden ρ^{-} -Mutanten nur solche als ρ_n^{-} (ρ°) gewertet, bei denen das Kreuzungsergebnis keinen höheren Prozentsatz diploider ρ^{-} -Kolonien ergab als in obiger Kontrollkreuzung. (Natürlich treten auch in Kreuzungen $\rho^{\circ} \times \text{RC}$ atmungsdefekte Diploide auf. Der ρ° -Partner kann zwar seinen petite-Charakter nicht auf die Zygoten übertragen, da er keine M-DNS mehr besitzt. Der Anteil atmungsdefekter Diploider entspricht etwa dem Prozentsatz der ρ^{-} -Zellen in der Population des RC-Partners.)

Tabelle 5

rho⁻ Zellen, nach 3 Tagen Wachstum der Mutante M12/ts-8 bei 36°C entstanden, wurden mit RC Stämmen gekreuzt und der Anteil RD-Diploider bestimmt (Grad der Suppressivität).

a x α		1761		H 243	
		getestete Kolonien	%RD	getestete Kolonien	%RD
M12/ts-8 rho ⁻ nach 3 Tg					
Isolat Nr.	1	99	60	142	50
	2	108	55	112	40
	3	324	16	79	25
	4	186	83	148	70
	5	298	14	127	29
	6	90	17	99	39
	7	213	25	220	32
	8	267	7	101	12
	9	347	20	132	37
	10	87	21	114	30
	11	153	5	244	12
	12	213	7	113	37
	13	-	-	112	30
	14	-	-	150	10
	15	-	-	269	50
	16	-	-	160	36
	17	-	-	257	21
	18	-	-	177	23

Tabelle 6

ρho^- -Zellen, nach 9 Tagen langem Wachstum der Mutante M12/ts-8 bei 36°C entstanden, wurden mit RC-Stämmen gekreuzt und der Anteil RD-Diploider bestimmt (Grad der Suppressivität).

a x α		1761		1422-4c		H 243	
		getestete Kolonien	%RD	getestete Kolonien	%RD	getestete Kolonien	%RD
M12/ts-8 ρho^- nach 9 Tagen							
Isolat Nr.							
1	160	23		146	7	-	-
2	134	36		124	18	-	-
3	183	47		141	32	-	-
4	174	40		107	24	-	-
5	180	50		138	30	-	-
6x	259	<u>0,4</u>		81	<u>2,5</u>	-	-
7	-	-		142	<u>44</u>	90	10
8	-	-		165	24	280	14
9	-	-		124	56	230	22
10	-	-		72	92	220	55
11	-	-		120	17	620	14
12	-	-		236	38	203	23
13x	158	<u>0,6</u>		142	<u>1</u>	-	-
14	225	<u>12,5</u>		100	<u>7</u>	-	-
15	153	25		116	8	-	-
16	156	25		156	8	-	-
17	237	5		87	<u>3,5</u>	-	-
18	152	10		115	10	-	-
19	-	-		310	23	180	17
20	-	-		360	16	219	17
21	-	-		198	56	888	32
22	-	-		550	32	103	15
23x	-	-		268	<u>0,8</u>	112	<u>3,5</u>

Möglicherweise sind die ρho^- Isolate Nr. 6, 13 und 23 ρho_n^- geworden, da hier der Grad der Suppressivität etwa dem der Kontrollkreuzung entspricht.

2) Verlust des RD/ts⁻-Markers in rho⁻-Mutanten

Da in der Literatur verschiedentlich von rho_s⁻-Stämmen berichtet wurde, die noch mitochondriale Information für Antibiotica-resistenzen besaßen (Gingold et al., 1969; Coen et al., 1970), sollte die Frage untersucht werden, ob auch rho⁻-Zellen, die nach Zucht der Mutante M12/ts-8 bei 36°C entstehen, ihre RD/ts⁻-Information noch besitzen. Dazu wurden nach 6 Stunden und nach 3 Tage langem Wachstum der Mutante M12/ts-8 bei 36°C 11 rho⁻-Kolonien isoliert und mit atmungskompetenten Stämmen diploidisiert. Die Diploiden wurden auf ihre Fähigkeit geprüft, auf YEP-Glyzerin bei 23°C und auf YEP-Glyzerin bei 36°C zu wachsen (Tabellen 7 und 8).

Tabelle 7

Der RD/ts⁻ Marker in rho⁻ Zellen, die nach 6 Std. Wachstum der Mutante M12/ts-8 bei 36°C entstanden sind.

a x α		1761			
		getestete Kolonien	% RD Kolonien	RD/ts ⁻ Kolonien	% RD/ts ⁻ Kolonien von RC Kolonien
M12/ts-8 rho ⁻ nach 6 Std.					
Isolat Nr.					
1	196	35	8	6	
2	188	25	4	3	
3	186	0	0	0	
4	455	25	0	0	
5	320	6	0	0	
6	163	40	0	0	
7	128	32	9	10	
8	106	27	21	27	
9	216	17	0	0	
10	237	13	0	0	
11	186	18	0	0	

Tabelle 8

a x α		H 243			
		getestete Kolonien	% RD Kolonien	RD/ts ⁻ Kolonien	% RD/ts ⁻ Kolonien von RC Kolonien
M12/ts-8 rho ⁻					
nach 6 Std					
Isolat Nr.	1	122	15	2	2
	2	52	21	3	7
	3	118	4	0	0
	4	220	13	0	0
	5	138	20	0	0
	6	80	30	0	0
	7	520	11	14	3
	8	334	7	9	3
	9	435	14	0	0
	10	230	13	2	1
	11	473	14	0	0

Die rho⁻-Isolate 1, 2, 7, 8 und eventuell auch das Isolat 10 tragen nach diesem Ergebnis noch den RD/ts⁻-Marker in ihrer mitochondrialen DNS. Der Versuch wurde einige Zeit später wiederholt, dabei ergab sich, daß die Isolate 2 und 10 keine RD/ts⁻-Information mehr besaßen und anscheinend rho_n⁻ geworden waren. Das ist nicht verwunderlich, da bekanntlich rho_s⁻-Stämme selten bezüglich ihrer mitochondrialen DNS stabil sind.

Unter 12 rho⁻-Mutanten, die nach 3 Tagen Wachstum bei 36°C entstanden waren, fanden sich keine, welche noch die RD/ts⁻-Information trugen.

V. Ausmaß der Veränderung der mitochondrialen DNS der Mutante M12/ts-8

1) Revertierbarkeit

Etablierte ρ^- Mutanten sind nicht revertierbar und können einander nicht komplementieren, da das Ausmaß der Deletionen oder Veränderungen der mitochondrialen DNS dieser Mutanten zu groß ist. Bekanntlich besitzen viele ρ^- Mutanten von Hefe verglichen mit ρ^- Zellen mitochondriale DNS mit veränderter Schwimmdichte. Bisher wurden keine stabilen mitochondrialen Punktmutationen beschrieben, die zur Atmungsdefizienz führen und somit revertierbar sein sollten.

Die Frage, ob es sich bei der Mutante M12/ts-8 um eine Punktmutation handeln kann, sollte durch Prüfung der Revertierbarkeit dieser Mutante untersucht werden. In Tabelle 9 ist das spontane Auftreten von Revertanten in den haploiden Stämmen M12/ts-8, D4-4A und den diploiden Stämmen D6 und D7 zusammengefaßt. (Für die Revertantensuche wurden 10^5 , 10^6 und 10^7 Zellen/Platte auf YEPD Medium gebracht und bei 36°C bebrütet.)

Tabelle 9

Revertanten der haploiden RD/ts^- Stämme M12/ts-8 und D4-4A, sowie der diploiden RD/ts^- Stämme D6 und D7 zum Phänotyp RC.

Stamm	plattierte Zellen	Revertanten
M12/ts-8	2×10^8	1
D4-4A	5×10^8	2
D6	6×10^7	60
D7	6×10^7	0

Die Revertanten zeigten atmungskompetenten Phänotyp. Es

kann sich bei ihnen um echte Rückmutationen oder um Suppressormutationen handeln. Neben kernkodierten Suppressoren sind auch mitochondriale Suppressoren denkbar. Sicherlich spielt auch die mitochondriale DNS bei der extranuclearen Suppression bestimmter Gene von Saccharomyces cerevisiae eine Rolle (Mitchell und Bevan, 1974). Um festzustellen, welche Art von Suppressor vorliegt, wurden die Revertanten mit einem atmungskompetenten Stamm diploidisiert, sporuliert und anschließend die Tetraden analysiert. Handelt es sich um einen kernkodierten Suppressor, so sollten von den 4 Sporen einer Tetrade 2 Sporen RD/ts^- und 2 Sporen RC sein. Bei einem mitochondrialen Erbgang des Suppressors wären alle 4 Sporen einer Diploiden RC. (Tabelle 10)

Tabelle 10

Tetradenanalyse der mit einem RC Stamm diploidisierten Revertanten

Diploide	Anzahl der analysierten Tetraden			
	4 Spo- ren	RC : RD/ts^-	3 Spo- ren	RC : RD/ts^-
M12/ ts -8 Rev1 x H 143	4	4 : 0	10	3 : 0
D4-4A Rev1 x M12	3	4 : 0	5	3 : 0
D4-4A Rev2 x M12	5	4 : 0	2	3 : 0

Das Ergebnis der Tetradenanalyse macht wahrscheinlich, daß es sich im Falle einer Suppressormutation bei allen 3 getesteten Revertanten um eine extranuclear vererbte handelt. Sind in diesen 3 Fällen beide, die Mutation zu RD/ts^- und ihre Suppressormutation mitochondrial codiert, und liegen die Mutationsorte genügend weit voneinander entfernt, so müßte nach Diploidisierung der Revertanten mit Wildtypen mitotische Segregation des RD/ts^- -Markers auftreten.

Es wird erwartet, daß beide Marker unabhängig voneinander in den diploiden Segreganten nachweisbar werden, und somit der RD/ts^- -Phänotyp wieder sichtbar würde. Die Ergebnisse der mitotischen Segregation sind in Tabelle 11 zusammengefaßt.

Tabelle 11

Mitotische Segregation der Revertanten:

a) der Revertante M12/ts-8 Rev 1

Diploide	getestete Kolonien	% RC Kolonien	% RD/ts^- Kolonien	identische Kreu- zungen
M12/ts-8 Rev 1 x H 243	1 634	100	0	7
" x 1761	1 175	100	0	6
" x IL 778-2B	614	100	0	5
Gesamtkoloniezahl	3 501			

b) der Revertante D1-4A Rev 1 und D4-4A Rev 2

Diploide	getestete Kolonien	RC, E^S %	RC, E^R %	$RD/ts^-, E^S$ %	$RD/ts^-, E^R$ %
H243 x D4-4A Rev 2	1 020	71	29	0	0
M12 x "	681	28	72	0	0
H 243 x D4-4A Rev 2	1 179	65	35	0	0
M12 x "	1 057	27	72,6	0,2	0,2
Kontrolle					
M12 x D4-4A RD/ts^- E^R	387	48	17	8	27
H 243 x	459	70	10	12	8

Unter den diploiden Segreganten der Revertanten M12/ts-8 Rev1 und D4-4A Rev 1 fanden sich keine RD/ts⁻-Kolonien. Die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen echter Rückmutanten ist damit gestiegen. Bei der Revertante D4-4A Rev 2 wuchsen unter den diploiden Segreganten insgesamt 2 Kolonien des Phänotyps RD/ts⁻E^R und zwei Kolonien des Phänotyps RD/ts⁻E^S. Dieser Wert: 4 RD/ts⁻-Kolonien unter 1057 getesteten Diploiden liegt jedoch in einer Größenordnung, die keine statistisch gesicherte Abgrenzung gegenüber der spontanen Häufigkeit der RD/ts⁻-Mutation zuläßt. Diese getesteten Revertanten können also echte Rückmutanten oder Suppressormutanten sein, deren Mutationsorte dem RD/ts⁻-Gen sehr eng benachbart sind. Nach dem Ergebnis der Tetradenanalyse erscheint eine im Kern co-dierte Suppressormutation ausgeschlossen.

2.) ω -Typ von Ausgangsstamm und Mutante

Slonimski und Mitarbeiter haben die mitotische Segregation mitochondrialer Marker genauer untersucht (Bolotin et al., 1971). Bezogen auf die Aufspaltung der diploiden Nachkommenschaft lassen sich zwei Typen von Kreuzungen unterscheiden:

- a) Die Parentaltypen treten unter den diploiden Segreganten etwa in gleicher Häufigkeit auf. Auch die Rekombinantentypen finden sich etwa im Verhältnis von 1 : 1.
- b) Ein Parentaltyp ist wesentlich häufiger als der andere und auch das Verhältnis der beiden Rekombinantentypen ist deutlich von 1 : 1 verschieden.

Im Fall b) spricht man von einer Polarität in Transmission und Rekombination. Verantwortlich für das unterschiedliche Kreuzungsverhalten ist der in der Nähe des Genortes für Chloramphenicol gelegene Genort ω , welcher in zwei Allelen, ω^+ und ω^- , auftritt. Kreuzungen zwischen ω^+ beziehungsweise

se zwischen ω^- -Stämmen zeigen keine Polarität (siehe a) und werden als homosexuell bezeichnet; Kreuzungen zwischen ω^+ mit ω^- -Stämmen weisen Polarität in Transmission und Rekombination auf und werden heterosexuell genannt. Der polare Einfluß des ω -Faktors erstreckt sich jedoch nur auf die ihm nahe gelegene Genorte C^R , S^R , E^R und RD/ts^- , nicht aber auf die Genorte O_I^R und P^R . Siehe Karte des mitochondrialen Genoms (Figur 3).

Inzwischen konnte auch nachgewiesen werden, daß ω tatsächlich ein mitochondriales Gen ist. (Slonimski, pers. Mitteilung). Da die Mutante M12/ts-8 vom Stamm M12 abgeleitet wurde, sollte man für beide Stämme den gleichen ω -Typ erwarten, falls die Veränderung der mitochondrialen DNS der Mutante M12/ts-8 nicht im ω -Locus liegt. Die Mutante und der Wildtyp wurden mit dem Stamm IL 102-5C E^R diploidisiert und die diploiden Segreganten analysiert. Das Ergebnis ist in Tabelle 12 dargestellt.

Das vom Modell der Phagenkreuzung (Visconti und Delbrück, 1953) abgeleitete Modell der Rekombination mitochondrialer DNS-Moleküle von Dujon (Dujon et al., 1974) fordert, daß mitochondriale Rekombination auf dem Niveau des Einzelereignisses stets nicht-reziprok ist. Im Falle der homosexuellen Kreuzungen ist die Rekombination jedoch auf Populationsebene reziprok, d.h. nicht-reziproke Rekombinationsereignisse verlaufen in beiden Richtungen gleich häufig. Dies äußert sich in der Gleichheit der Anzahl der Parental- und Rekombinantentypen. Dasselbe gilt in heterosexuellen Kreuzungen für die außerhalb des ω -Einflusses gelegenen apolaren Regionen.

In den polaren Regionen (C^R , S^R , E^R) ist die Rekombination in heterosexuellen Kreuzungen auch auf Populationsebene nicht reziprok, und zwar ist die einseitige Wahrscheinlichkeit des nicht-reziproken Ereignisses in der Nähe von ω am größten und nimmt

mit der Entfernung von ω ab. Die Duplikation der mitochondrialen DNS erfolgt dabei immer zugunsten des ω^+ -Partners (Polarität der Transmission), die Majoritätsklasse der Rekombinanten trägt immer Marker der polaren Region des ω^+ -Partners.

In homosexuellen Kreuzungen beträgt das Maximum der Rekombination 25%, da in einem panmiktischen Pool von DNS-Molekülen in der Diploiden sowohl homologe als auch heterologe Paarungen in gleicher Häufigkeit auftreten. Nur der genetische Austausch von heterologen DNS-Molekülen führt zu phänotypisch nachweisbaren Rekombinanten. Die wesentlich höhere Rekombinationshäufigkeit in heterosexuellen Kreuzungen kann deshalb am besten durch einen nicht-reziproken Prozeß erklärt werden.

Das Kreuzungsergebnis (Tabelle 12) zeigt etwa das typische Bild einer homosexuellen und einer heterosexuellen Kreuzung. Durch die Mutation der mitochondrialen DNS zu RD/ts⁻ hat sich am ω -System nichts geändert. Wildtyp und Mutante erweisen sich als ω^- . In Kreuzungen mit Stamm M12 und dessen isonuclearen Abkömmlingen ist die Ausbeute an Rekombinanten geringer (Tabelle 4) als gewöhnlich bei Kreuzungen anderer Stämme beobachtet (Wolf et al., 1973). Es wird diskutiert, ob der Stamm M12 eine dominante oder semidominante Kernmutation trägt, welche die mitochondriale Rekombinationsrate vermindert.

Tabelle 12 a

Vergleich des ω -Typs von Mutante M12/ts-8 und ihrem Wildtyp M12 mit Hilfe mitotischer Segregation

Diploide	Parentaltypen		Rekombinantentypen		getestete Kolonien
	RD/ts ⁻ , E ^S	RC, E ^R	RD/ts ⁻ , E ^R	RC, E ^S	
M12 × IL102-5C E ^R	44%	56%	—	—	446
M12/ts-8 × IL102-5C E ^R	28%	57%	5,6%	9,8%	494

Tabelle 12 b

Verhalten zweier RD/ts⁻-Isolate in homosexueller und heterosexueller Kreuzung

Diploide	C ^S E ^R RD/ts ⁻	C ^S E ^R RC	C ^S E ^S RD/ts ⁻	C ^S E ^S RC	C ^R E ^R RD/ts ⁻	C ^R E ^R RC	C ^R E ^S RD/ts ⁻	C ^R E ^S RC	getestete Kolonien
D4-1D a ile ⁻ ω ⁻ E ^R , RD/ts ⁻ x S11-2D α ura ⁻ ω ⁻ C ^R , RC	54,0	5,8	3,5	2,3	3,8	1,4	4,5	2 5%	343
D4-3C a ile ⁻ ω ⁻ E ^R , RD/ts ⁻ x IL187-2D α ura ⁻ trp ⁻ ω ⁺ C ^R , RC	48,0	28,5	2,7	19,5	0	0	0	1,0%	525

3.) Vergleich des Grads der Suppressivität in Kreuzungen von Ausgangsstamm und Mutante mit bestimmten ρ_s^- -Stämmen.

Etablierte ρ_s^- -Stämme zeigen, mit demselben Wildtyp gekreuzt, immer etwa den gleichen Grad an Suppressivität. Mit verschiedenen Stämmen jedoch erhält man für die gleiche ρ_s^- -Mutante dafür verschiedene Werte (Michaelis et al., 1971).

Die Mutante M12/ts-8 und ihr Ausgangsstamm M12 wurden mit 3 spontan entstandenen ρ_s^- -Mutanten des Stammes 1422-4C diploidisiert und die diploiden Segreganten analysiert. Dabei zeigten alle 3 ρ_s^- -Stämme des Stammes 1422-4C mit dem Stamm M12 einen mittleren Grad von Suppressivität, nämlich um 65%. Mit der Mutante dagegen lag der Grad der Suppressivität um 95%. Die restlichen 5% waren etwa zur Hälfte RC, zur Hälfte RD/ts⁻ (Tabelle 13). Die Kreuzung Wildtyp x ρ_s^- und Mutante RD/ts⁻ x ρ_s^- wurde jeweils mit der gleichen Population von ρ_s^- -Zellen durchgeführt, da bei diesen leicht eine Instabilität ihrer mitochondrialen DNS auftritt.

Tabelle 13

Grad der Suppressivität in Kreuzungen von ρ_s^- -Stämmen mit M12 und M12/ts-8

Diploide				getestete Kolonien	% RD Kolonien
M12	x 1422-4c	ρ_s^-	1	351	61
"	x "	ρ_s^-	2	411	68
"	x "	ρ_s^-	3	295	63
M12/ts-8	x 1422-4c	ρ_s^-	1	377	98
"	x 1422-4c	ρ_s^-	2	365	96
"	x 1422-4c	ρ_s^-	3	502	97

Die Stämme M12 und M12/ts-8 unterscheiden sich nur durch ihre mitochondriale Mutabilität zu RD/ts^- . Möglicherweise beeinflusst diese Mutation das Kreuzungsergebnis in Kreuzungen mit ρ_s^- -Stämmen dahingehend, daß sich der petite-Charakter der ρ_s^- -Stämme stärker durchsetzen kann. Es ist auch denkbar, daß die Mutante M12/ts-8 weniger funktionstüchtige mitochondriale DNS-Moleküle besitzt.

- 4.) Einfluß der RD/ts^- -Mutation auf die Stabilität eines weiteren mitochondrialen Markers während der Mutagenese mit EB.

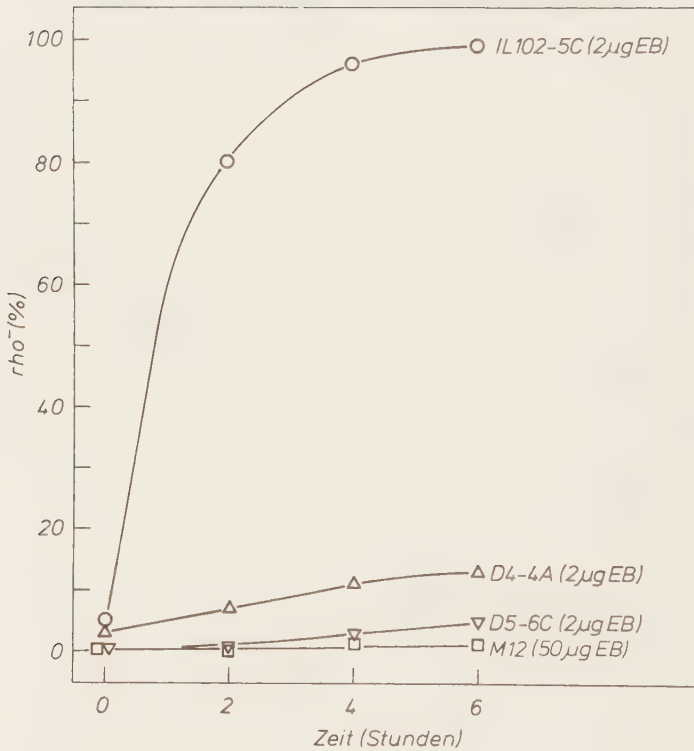
EB induziert bei Saccharomyces cerevisiae sehr wirkungsvoll unter Wachstumsbedingungen sowie Bedingungen des Wachstumsstillstandes ρ^- -Mutanten (Slonimski et al., 1968). Sein Einbau erfolgt zwischen die Basenpaare der mitochondrialen DNS. Diese wird allmählich (Waring, 1965; Bauer und Vinograd, 1971; Paoletti und le Pecq, 1971; Denhardt und Kato, 1973) durch Zerstückeln und damit verbundenen Abbau zerstört (Goldring et al., 1970; Perlman und Mahler, 1971).

Die haploiden Stämme D4-4A und D5-6C mit dem mitochondrialen Genom $E^R RD/ts^-$ und $E^R RC$ wurden mit EB behandelt und die dabei entstandenen ρ^- -Zellen auf den Verlust des E^R -Markers hin untersucht (siehe Material und Methoden). Die Frage war, ob durch die Mutation zu RD/ts^- die mitochondriale DNS von EB leichter angegriffen wird und somit insgesamt als instabiler bezeichnet werden kann.

Zunächst wurde die zu Mutationsinduktion geeignete Konzentration des EB gesucht. Hierzu wurden die Ausgangsstämme M12 und IL 102-5C, sowie zwei Sporen der Diploiden M12/ts-8 x IL 102-5C, nämlich D4-4A $E^R RD/ts^-$ und D5-6C $E^R RC$ mit verschiedenen Konzentrationen EB unter Bedingungen des Wachstumsstillstandes behandelt und nach bestimmten Zeiten der Pro-

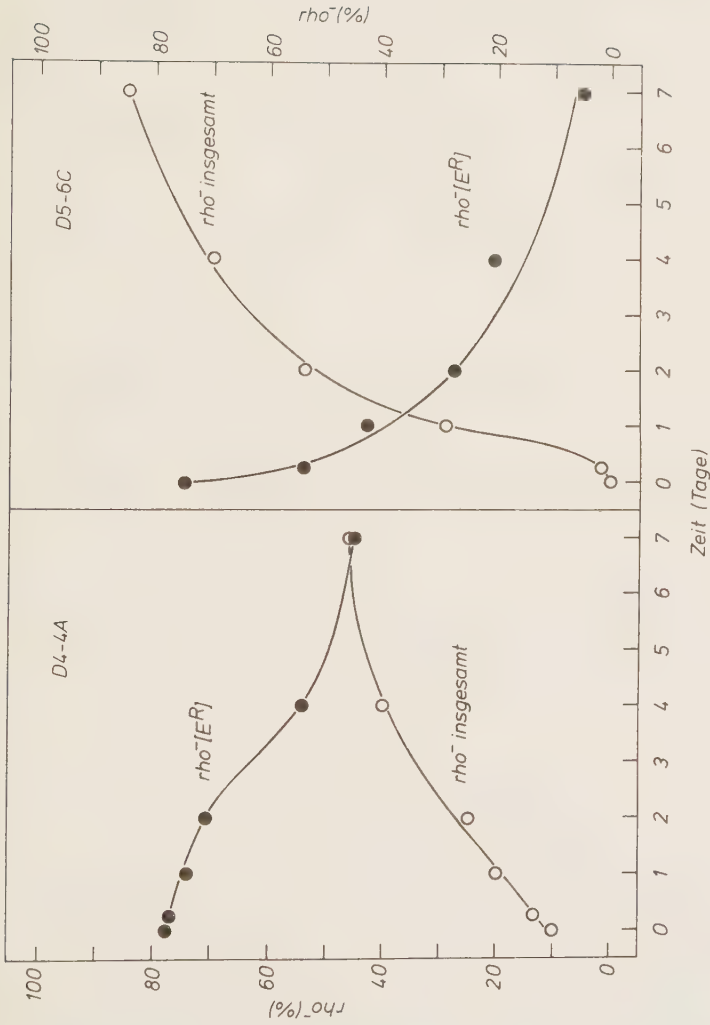
zentsatz der ρ^- -Zellen in der Population bestimmt. Dabei zeigte sich, daß EB-Einwirkung unter Bedingungen des Wachstumsstillstandes bei den angegebenen Stämmen unterschiedlich stark RD-Mutanten induziert. Der Stamm M12 ist bezüglich seiner spontanen Mutationsrate zu ρ^- sehr stabil. Interessanterweise verhält er sich auch hier gegenüber einer relativ hohen Konzentration ($50 \mu\text{g/ml}$) des EB sehr resistent (Figur 8). Auch beim Stamm D5-6C scheint EB zunächst nur relativ wenig ρ^- -Zellen zu induzieren. Bei diesem Stamm nimmt die Anzahl der ρ^- -Zellen bei längerer Behandlung mit EB (Figur 9) nach etwa 1 Tag stark zu. Die anfänglich relativ schwache ρ^- -Induktion mit EB beim Stamm D5-6C wird damit erklärt, daß dieser Stamm außergewöhnlich stark klumpt. Es genügt eine einzige atemungskompetente Zelle in einem Zellklumpen, um eine atemungskompetente Kolonie entstehen zu lassen. Erst nach längerem Schütteln in Puffer lösen sich die Zellen voneinander. Nach 7 Tagen Behandlung mit EB enthält der Stamm D4-4A E^R_{RD/ts^-} etwa 50% ρ^- -Zellen und der Stamm D5-6C E^R_{RC} annähernd 85% ρ^- -Zellen. Es besteht also auch bei diesen Stämmen ein Unterschied in der Mutierbarkeit zu ρ^- durch EB-Behandlung. EB induziert beim atemungskompetenten Stamm etwas stärker ρ^- -Zellen. Zu einem Zeitpunkt, bei dem beide Stämme etwa 40% ρ^- -Zellen in der Population aufweisen, tragen beim temperatursensibel atemungsdefekten Stamm D4-4A etwa 65% der getesteten ρ^- -Zellen den E^R -Marker, während beim atemungskompetenten Stamm D5-6C nur noch etwa 35% der getesteten ρ^- -Zellen die E^R Information noch besitzen. (Figur 9)

Insgesamt läßt sich sagen, daß bei dem hier beschriebenen Stamm D4-4A $RD/ts^- E^R$ die mitochondriale DNA durch EB-Behandlung nicht schneller abgebaut wird, verglichen mit einem atemungskompetenten Stamm der gleichen Elternstämme. Die Re-



Figur 8

Induktion der petite-Mutation durch Ethidiumbromid bei verschiedenen *Saccharomyces*-Stämmen. Der Stamm M12 erweist sich selbst höheren Ethidiumbromidkonzentrationen gegenüber als sehr resistent.



Figur 9

Verlust des mitochondrialen Marker E^R in ρ^- -Zellen während der Induktion der petite-Mutation durch Ethidiumbromid. Die Stämme tragen folgende mitochondriale Marker: D4-4A: RD/ts^- , E^R ; D5-6C: RC, E^R

sistenz geht sogar in dem atmungskompetenten Stamm deutlich schneller verloren. Somit hat bei dem untersuchten Stamm die RD/ts⁻-Mutation keinen instabilisierenden Einfluß. (Die Prozentsätze der rho⁻-Zellen mit E^R Marker beziehen sich auf durchschnittlich 100 getestete rho⁻-Zellen).

VI. Einfluß von Hemmstoffen der mitochondrialen Proteinsynthese auf die rho⁻-Induktion der Mutante M12/ts-8

Weislogel und Butow (1970) berichteten von einer kältesensiblen Mutante, die während des Wachstums bei 18°C innerhalb von 4 Generationen etwa 90 prozentig zu rho⁻ mutiert. Wächst diese Mutante bei 28°C, so kann dieser Effekt ebenfalls beobachtet werden, wenn in das Medium Chloramphenicol (4 mg/ml) gegeben wird. Ohne Chloramphenicol entspricht die Mutationsrate zu rho⁻ bei 28°C der des Wildtyps. Markierung der mitochondrialen Proteine in Gegenwart von CHX und Trennung der Proteine mit Hilfe von SDS-Gelelektrophorese zeigen Änderungen des Gel-Profils der mitochondrialen Proteine der Mutante während der petite-Induktion bei 18°C, verglichen mit dem zugehörigen Wildtyp. Speziell 3 von 8 Proteinkomponenten erscheinen entweder kaum oder stärker. Es wird diskutiert, daß die Änderungen des Gel-Profils daher rührten, daß als Folge eines kältesensiblen Syntheseschritts falsche Inkorporation von Proteinen in die Membran erfolgt. Auch während der petite-Induktion mit Chloramphenicol bei dieser kältesensiblen Mutante erscheint das mitochondriale Gel-Profil merklich verändert. Es wird deshalb angenommen, daß dasselbe Protein (oder dieselben Proteine) nach Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese mit Chloramphenicol bei der Mutante limitiert ist. Diese Erklärung würde mit den Befunden von Williamson et al. (1971) übereinstimmen, die gefunden haben, daß nach längerer Hemmung der mitochondrialen Pro-

teinsynthese (8-14 Generationen) mit Erythromycin bzw. Chloramphenicol ebenfalls ρ^- -Zellen gebildet werden. Auch hier entstehen dann etwa innerhalb 4 Generationen annähernd 100% ρ^- -Zellen.

Es besteht die Möglichkeit, daß bei der Mutante M12/6s-8 auch durch Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese ρ^- -Zellen induziert werden und somit eine temperatursensible Änderung der mitochondrialen Proteinsynthese vorliegt.

Die Mutante M12/ts-8 und der zugehörige Wildtyp wurden deshalb in Gegenwart von 4 mg/ml Erythromycin bzw. Chloramphenicol bei 23°C etwa 40 Generationen lang gezüchtet. (Tabelle 14).

Tabelle 14

Wirkung von Erythromycin und Chloramphenicol auf die ρ^- -Induktion bei der Mutante M12/ts-8

Stamm	Kohlenstoffquelle	Antibiotikum	getestete Kolonien	% ρ^- nach 40 Generationen
M12/ts-8	Galaktose	-	650	1
"	"	Erythromycin	480	2
"	"	Chloramphenicol	370	2
"	Glukose	-	410	1,5
"	"	Erythromycin	540	3
"	"	Chloramphenicol	315	3

Während des Wachstums der Mutante M12/ts-8 mit einem Hemmer der mitochondrialen Proteinsynthese konnte kein signifikanter Anstieg der ρ^- -Zellen über 40 Generationen hin beobachtet werden. Eine Wiederholung des Experiments brachte das gleiche Ergebnis. Messung der mitochondrialen Proteinsynthese der Mutante M12/ts-8 nach Übergang zur höheren Temperatur brachte allmählichen Abfall

derselben, der etwa dem Anstieg der ρ^+ -Zellen in der Population entsprach (Bandlow, persönl. Mitteilung).

ZUSAMMENFASSUNG

- I) Im Saccharomyces cerevisiae Stamm M12 wurden mit Nitroso-guanidin temperatursensibel atmungsdefekte Mutanten induziert. Die Häufigkeit der gesuchten Mutanten betrug etwa 0,02% der Überlebenden.
- II) Eine der isolierten temperatursensibel atmungsdefekten Mutanten, M12/ts-8, erwies sich auf grund folgender Kriterien als mitochondrial vererbt:
 - a) Auftreten der mitotischen Segregation.
 - b) Keine Aufspaltung des getesteten Markers in der Tetradenanalyse nach Meiose.
 - c) In Kreuzungen mit Stämmen ohne mitochondriale DNS erwiesen sich alle Diploiden als temperatursensibel atmungsdefekt.
- III) Bei Zucht der Mutante M12/ts-8 in Glukosemedium bei 36°C wird die Gesamtpopulation innerhalb von 4 - 6 Generation zu mehr als 90% ρ^- . Unter Wachstumsbedingungen erfolgt bei der höheren Temperatur keine Induktion der petite-Mutation. Diploide Abkömmlinge der Mutante M12/ts-8 produzieren unter Wachstumsbedingungen bei der höheren Temperatur ebenfalls petites, jedoch erheblich langsamer.
- IV) Die während des Wachstums der Mutante M12/ts-8 bei der höheren Temperatur gebildeten ρ^- -Zellen erwiesen sich auch bei längerem Wachstum der Mutante bei 36°C meist als ρ^- suppressiv. In nach 6 Stunden Wachstum bei höherer Temperatur gebildeten ρ^- -Mutanten war der RD/ts⁻-Marker noch in etwa 30% der Fälle vorhanden.
- V) Da die Mutante M12/ts-8 spontan revertiert, handelt es sich um eine Punktmutation. Die Mutation der mitochondrialen DNS betrifft nicht die ω -Region, da der ω -Typ in Mutante und

zugehörigem Wildtyp gleich ist.

Bestimmte ρ_s^- -Stämme erweisen sich in Kreuzungen mit der Mutante M12/ts-8 stärker suppressiv als in Kreuzungen mit dem zugehörigen Wildtyp. Möglicherweise besitzt die Mutante M12/ts-8 weniger funktionstüchtige Mitochondrien. Durch den RD/ts⁻-Marker ist die mitochondriale DNS gegenüber Ethidiumbromidwirkung nicht instabiler geworden. Hemmstoffe der mitochondrialen Proteinsynthese beeinflussen die Induktion der ρ^- -Mutation bei der Mutante M12/ts-8 nicht.

DISKUSION

Seit der Entdeckung der mitochondrialen DNS beschäftigen sich eine Reihe von Forschergruppen mit der zentralen Frage nach dem Informationsgehalt der DNS dieses Organells. Mitochondrien besitzen als wahrscheinlich ehemalige Endosymbionten ein eigenes Proteinsynthesystem. Daraus schloß man, was später auch durch experimentelle Befunde erhärtet wurde, daß ein Teil der mitochondrialen DNS für Funktionen der Proteinsynthese codieren muß. (Wintersberger, 1965). Die petite-Mutation ist pleiotrop, d.h. auf Grund der Veränderung der mitochondrialen DNS oder ihres Ausfalls ist eine Reihe von Eigenschaften, unter anderem auch die Befähigung zur Atmung, verlorengegangen (F. Sherman, 1964; Roodyn und Wilkie, 1968). Bei der Suche nach mitochondrial vererbten Mutanten der Atmungskette stieß man immer auf denselben Mutantentyp, nämlich die ρ^- -Mutante. Der Versuch, über mitochondriale Punktmutanten der Atmungskette zu Aussagen über den Informationsgehalt der mitochondrialen DNS zu kommen, war zunächst erfolglos.

Angeregt durch die Erkenntnis, daß mitochondriale und bakterielle Proteinsynthese durch dieselben Antibiotica spezifisch gehemmt werden können (Clark-Walker und Linnane, 1968) isolierten eine Reihe von Forschern (siehe Review von Dujon und Michaelis, 1974) Resistenzmutanten gegen diese Antibiotica, welche sich als mitochondrial vererbt erwiesen. Die Anzahl mitochondrialer Gene für Antibiotica-Resistenz war jedoch gering, sodaß die Ergebnisse einer formalen mitochondrialen Genetik unter Benutzung dieser Resistenzgene als Marker noch sehr fragmentarisch sind (Figur 3).

Die in dieser Arbeit beschriebene temperatursensibel atmungsdefekte Mutante stellt einen dritten, neuen Typ mitochondrialer Mutationen dar.

Die temperatursensible Mutation genügte allen Kriterien einer mitochondrial vererbten Mutation (Bolotin et al., 1971):

- 1.) Sie segregiert während der Mitose, nicht aber in der Meiose.
- 2.) In Kreuzungen mit DNS-freien (ρ^0) petites sind alle Diploiden temperatursensibel atmungsdefekt.
- 3.) Die genetische Information für Temperatursensitivität kann durch petite-Induktion mit Ethidiumbromid eliminiert werden.

Das Auftreten spontaner Revertanten läßt darauf schließen, daß es sich bei dieser Mutante um eine mitochondriale Punktmutation, nicht aber um eine Deletion etwa des ρ^- -Typs, handelt.

Wie durch Tetradenanalyse gezeigt werden konnte, beruht die Reversion auf einem mutativen Ereignis innerhalb der mitochondrialen DNS. Ein mitochondrialer Suppressor wurde auch von Mutanten der Bäckerhefe beschrieben, welche sich auf Medium mit Methylenblau stark anfärben (Mitchell und Bevan, 1974). Die Behandlung der Mutante ts-8 mit Ethidiumbromid unter Bedingungen des Wachstumsstillstandes zeigte, daß die mitochondriale DNS unter Einfluß der ts-Mutation nicht empfindlicher gegen Ethidiumbromid geworden war.

Auffallend jedoch ist der Einfluß der mitochondrialen ts-Mutation auf den Grad der Suppressivität von petites. Die Tatsache, daß dieselben petites mit der Mutante gekreuzt einen wesentlich höheren Grad an Suppressivität zeigen, läßt vermuten, daß unter den Bedingungen der Kreuzung die Mitochondrien der ts-Mutante einen selektiven Nachteil verglichen mit den Wildtyp-Mitochondrien besitzen und dadurch die Zahl der in die Kreuzung eingehenden ts-DNS-Moleküle geringer ist. Die dadurch an Zahl überwiegenden petite-DNS-Moleküle könnten so den höheren Grad an Suppressivität bedingen.

Weislogel und Butow (1970) isolierten eine kältesensible, karyotische Mutante, welche ähnlichen Phänotyp zeigt, nämlich die Bildung von über 90% ρ^- -Zellen innerhalb von 4 - 6 Generationen bei der

nichtpermissiven Temperatur. Der gleiche Effekt läßt sich durch Hemmung der Proteinsynthese mit Antibiotica zeigen. Während die *petite*-Induktion in dieser Mutante mit Sicherheit auf der Hemmung der Proteinsynthese beruht, konnten Bandlow und Schweyen (pers. Mitteilung) für die Mutante M12/ts-8 durch Einbau radioaktiver Aminosäuren in Gegenwart von Cycloheximid zeigen, daß die mitochondriale Proteinsynthese in dereprimierten Zellen zwar temperaturempfindlich ist, die Abnahme der Einbaurrate jedoch erheblich langsamer erfolgt als für eine temperaturempfindliche Funktion zu erwarten wäre. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, daß die Abnahme der Proteinsyntheserate durch Senken der Temperatur oder Zugabe von Glukose reversibel ist. Die Atmungskontrolle ist bei der Mutante deutlich temperaturempfindlicher als beim Wildtyp, jedoch nicht direkt temperaturlabil. Atmungsaktivität im bc_1 -Segment und im Cytochrom aa_3 der Atmungskette nimmt in Glukose bei 36°C schnell, andere Atmungsaktivitäten nehmen wiederum nur langsam ab. Es kann daher geschlossen werden, daß weder die Atmungskette und Energiegewinnung noch die mitochondrialen Ribosomen eine thermolabile Funktion enthalten, daß jedoch beides auf grund von Sekundärereignissen in längeren Zeiträumen beeinträchtigt wird.

Obwohl der primäre Defekt für die Mutante M12/ts-8 noch nicht bekannt ist, kann man aussagen, daß er sicherlich mit dem der kältesensiblen Mutante von Weislogel und Butow nicht identisch ist.

Untersuchungen der bei der höheren Temperatur in der Mutante M12/ts-8 gebildeten Proteine zeigen (Bandlow, pers. Mitteilung), daß mit zunehmender Einwirkung der nichtpermissiven Temperatur höhermolekulare mitochondrial synthetisierte Untereinheiten der Cytochromoxidase verschwinden und statt dessen niedermolekulare Proteine verschiedenen Molekulargewichts erscheinen. Als Folge sind funktionsuntüchtige Mitochondrien zu erwarten. Da in Glycerin-

medium wegen des temperatursensiblen Defekts keine Energie gewonnen werden kann, wird dieser Zustand gleichermaßen eingefroren, d.h. die petite-Entstehung unterbleibt aus Energiemangel. In Glukosemedium verfügt die Zelle jedoch über die nötige Energie für die mitochondrialen Syntheseleistungen, mehr und mehr funktionsuntüchtige Mitochondrien werden gebildet und die Wildtypmitochondrien ausverdünn. Der Vergleich der Kinetik der petite-Entstehung in haploiden und diploiden Isolaten der Mutante M12/ts-8 liefert einen weiteren Beweis dafür, daß die petites durch Ausverdünnung intakter Mitochondrien nur unter Wachstumsbedingungen entstehen können. Verursacht durch einen Regulationsmechanismus zwischen Kern und Mitochondrien wird ein bestimmtes Verhältnis von Kern-DNS zu mitochondrialer DNS eingehalten, so daß eine diploide Zelle etwa doppelt so viel Mitochondrien-DNS und damit doppelt so viel Mitochondrien enthält als eine haploide (Williamson, 1970). Die wesentlich langsamere petite-Entstehung in der diploiden ts-Mutante steht in völliger Übereinstimmung mit der beschriebenen Hypothese der petite-Entstehung durch Ausverdünnen der Mitochondrien. Durch Untersuchungen von Schweyen (pers. Mitteilung) konnte der ts-Marker inzwischen auf der mitochondrialen DNS lokalisiert werden. Daten aus 2- und 3-Punktkreuzungen mit den bekannten Markern ergaben Kopplung zur C-E-Region. Durch Abschätzung der Einfach- und Doppelcrossover-Häufigkeiten ließ sich eine Lokalisierung innerhalb der C-E-Region ausschließen. Eine Lage der ts-Mutation links oder rechts des C-E-Segmentes war in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Rekombinationsanalysen.

Weiteren Aufschluß ergab die Kartierung mittels petite-Induktion. Diese Methode geht von der Überlegung aus, daß ein Paar von Markern umso häufiger in einer petite erhalten bleibt, je näher es beieinander liegt. Eine Kartierung dieser Art führte zur Lokalisierung des ts-Markers links relativ nahe der C-Region.

In jüngster Zeit wurden mitochondriale Punktmutanten mit atmungsdefektem Phänotyp gefunden (Storm et al., 1974; Tzagoloff, pers. Mitteilung; Mahler, pers. Mitteilung). Es wäre lohnend, sie mit der Mutante ts-8 biochemisch und physiologisch zu vergleichen und die Lage ihrer Mutationsorte auf der mitochondrialen DNS zu kartieren.

Durch die Kartierung des ts-Markers wurde eine neue Region auf der mitochondrialen DNS erschlossen, so daß heute 4 im Rekombinationsexperiment nahezu ungekoppelte Regionen vorliegen (die CE-, O-, P-, und ts-Region). Mit Hilfe der Delektionskartierung und des ts-Markers war es erstmals möglich, die ungekoppelten Marker O und P in ihrer relativen Lage auf dem mitochondrialen Genom zu lokalisieren. Durch petite-Mutanten, welche allein den ts-Marker tragen, steht für die weitere Charakterisierung der mitochondrialen DNS durch Hybridisierung (zur Lokalisierung von RNS-Genen) eine weitere genetisch markierte Region zur Verfügung.

Durch den ts-Marker und weitere Mutationen im Bereich zwischen ts-8 und der ω -Region könnten auch tiefere Einsichten in die Phänomene der Transmission und Rekombination mitochondrialer Gene gewonnen werden.

LITERATURVERZEICHNIS

Avner, P.R.; Coen, D.; Dujon, B.; Slonimski, P.P.:

Mitochondrial genetics. IV. Allelism and mapping studies of oligomycin resistant mutants in *Saccharomyces cerevisiae*.
Molec. Gen. Genetics 125, 9, (1973)

Bachofen, V.; Schweyen, R.J.; Wolf, K.; Kaudewitz, F.:

Quantitative selection of respiratory deficient mutants in yeast by triphenyltetrazolium chloride. Zeitschrift für Naturforschung 27, 252, (1972)

Bauer, W.; Vinograd, J.: The use of intercalative dyes in the study of closed circular DNA. In: Progress in Molecular and Subcellular Biology 2. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, (1971)

Beale, G.H.; Knowles, J.K.C.; Tait, A.: Mitochondrial genetics in *Paramecium*. Nature 235, 396, (1972)

Beck, J.C.; Parker, J.H.; Balcavage, W.X.; Mattoon, J.R.:

Mendelian genes affecting development and function of yeast mitochondria. In: Autonomy and biogenesis of mitochondria and chloroplasts, a symposium sponsored by International Union of Biochemistry, Australian Academy of Sciences. N.K. Boardman, A.W. Linnane, R.M. Smillie eds., North-Holland Publishing Company, Amsterdam-London, 194, (1971)

Bernardi, G.; Faures, M.; Piperno, G.; Slonimski, P.P.:

Mitochondrial DNA's from respiratory-sufficient and cytoplasmic respiratory-deficient mutant yeast. J. Mol. Biol. 48, 23, (1970)

- Bolotin, M.; Coen, D.; Deutsch, J.; Dujon, B.; Netter, P.;
Petrochilo, E.; Slonimski, P.P.: La recombinaison des
mitochondries chez *Saccharomyces cerevisiae*. Bull. Inst.
Pasteur 69, 215, (1971)
- Bunn, C.L.; Mitchell, C.H.; Lukins, H.B.; Linnane, A.W.:
Biogenesis of mitochondria. XVIII. A new class of cytoplas-
mically determined antibiotic resistant mutants in *Saccharo-
myces cerevisiae*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 67, 1233,
(1970)
- Carnevali, F.; Piperno, G.; Tecce, G.: Satellite componente of
DNA from a cytoplasmic "petite" mutant of *Saccharomyces
cerevisiae*. Accad. Naz. Lin. Rend. Sci., Fis. Mat. Nat.
41, (Ser. 8), 194, (1966)
- Clark-Walker, G.D.; Linnane, A.W.: In vivo differentiation of
yeast cytoplasmic and mitochondrial protein synthesis with
antibiotics. Biochem. Biophys. Res. Commun. 25, 8, (1966)
- Coen, D.; Deutsch, J.; Netter, P.; Petrochilo, E.; Slonimski, P.P.:
Mitochondrial genetics. I. Methodology and phenomenology.
In: Control of organelle development. Symposia of the society
of experimental biology XXIV, P. Miller ed., Cambridge:
at the University Press, 449, (1970)
- Denhardt, D.T.; Kato, A.C.: Comparison of the effect of ultra-
violet radiation and ethidium bromide intercalation on the
conformation of superhelical X 174 replicative form DNA.
J. Mol. Biol. 77, 479, (1973)
- De Vries, H.; Kroon, A.M.: Euflavin and ethidium bromide inhi-
bitors of mitochondriogenesis in regenerating rat liver.
FEBS Letters 7, 347, (1970)

- Dujon, B.; Michaelis, G.: V. Extrakaryotic inheritance. In: Fortschritte der Botanik 36. Herausgeber: H. Ellenberg, K. Esser, H. Merxmüller, E. Schnepf, H. Ziegler. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 236, (1974)
- Dujon, B.; Slonimski, P.P.; Weill, L.: A model for recombination and segregation of mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 78, 415, (1974)
- Ephrussi, B.; Hottinguer, H.; Chimenes, A.-M.: Action de l'acriflavine sur les levures. I. La mutation "petite colonie". Ann. Inst. Pasteur, Paris 76, 351, (1949)
- Ephrussi, B.; de Margerie-Hottinguer, H.; Roman, H.: Suppressiveness: a new factor in the genetic determination of the synthesis of respiratory enzymes in yeast. Proc. Nat. Acad. Sci. 41, 1065, (1955)
- Ephrussi, B.; Grandchamp, S.: Études sur la suppressivité des mutants à déficience respiratoire de la levure I. Existence au niveau cellulaire de divers "degrés de suppressivité". Heredity (London) 20, 1, (1965)
- Ephrussi, B.; Jakob, H.; Grandchamp, S.: Études sur la suppressivité des mutants à déficience respiratoire de la levure II. Etapes de la mutation grande en petite provoquée par le facteur suppressif. Genetics (Princeton) 54, 1, (1966)
- Faye, G.; Fukuhara, H.; Grandchamp, C.; Lazowska, J.; Michel, F.; Casey, J.; Getz, G.S.; Locker, J.; Rabinowitz, M.; Bolotin-Fukuhara, M.; Coen, D.; Deutsch, J.; Dujon, B.; Netter, P.; Slonimski, P.P.: Mitochondrial nucleic acids in the petite colonie mutants: deletions and repetitions of genes. Biochimie 55, 779, (1973)

- Fukuhara, H.; Kujawa, C.: Selective inhibition of the in vivo transcription of mitochondrial DNA by ethidium bromide and by acriflavine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 1002, (1970)
- Gingold, E.; Saunders, G.; Lukins, H.; Linnane, A.W.: Biogenesis of mitochondria X. Reassortment of the cytoplasmic genetic determinants for respiratory competence and erythromycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 62, 735, (1969)
- Goldring, E.S.; Grossman, L.I.; Krupnik, D.; Cryer, D.R.; Marmur, J.: The petite mutation in yeast. Loss of mitochondrial deoxyribonucleic acid during induction of petites with ethidium bromide. *J. Mol. Biol.* 52, 323, (1970)
- Hartwell, L.H.: Macromolecule synthesis in temperature-sensitive mutants of yeast. *J. Bacteriol.* 93, 1662, (1967)
- Hollenberg, C.P.; Borst, P.; van Bruggen, E.F.J.: Mitochondrial DNA: 25 closed circular duplex DNA molecules in wild type yeast mitochondria. Structure and genetic complexity. *Biochim. Biophys. Acta* 209, 1, (1970)
- Kutzleb, R.; Schweyen, R.J.; Kaudewitz, F.: Extrachromosomal inheritance of paromomycin resistance in yeast. Isolation and characterization of mutants. *Molec. Gen. Genetics* 125, 91, (1973)
- Lamb, A.J.; Clark-Walker, G.D.; Linnane, A.W.: The biogenesis of mitochondria VI. The differentiation of mitochondrial and cytoplasmic protein synthesizing systems in vitro by antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta* 161, 415, (1968)

- Linnane, A.W.; Saunders, G.W.; Gingold, E.B.; Lukins, H.B.:
Biogenesis of mitochondria. V. Cytoplasmic inheritance of
erythromycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 59, 903, (1968)
- Mahler, H.R.; Mehrota, B.D.; Perlman, P.S.: Formation of yeast
mitochondria. V. Ethidium bromide as a probe for the functions
of mitochondrial DNA. In: Progress in Molecular and Subcel-
lular Biology 2. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg,
New York, (1971)
- Maroudas, N.G.; Wilkie, D.: Ultraviolet irradiation studies on
the cytoplasmic determination of the yeast mitochondrion.
Biochim. Biophys. Acta 166, 681, (1968)
- Marquart, H.; Zimmermann, F.K.; Schwaier, R.: Die Wirkung
krebbsauslösender Nitrosamine und Nitrosamide auf das Adenin-
6-45-Rückmutationssystem von *Saccharomyces cerevisiae*.
Zeitschrift für Vererbungslehre 95, 82, (1964)
- Mayer, V.W.; Legator, M.S.: Induction by N-methyl-N'-nitro-
N-nitrosoguanidine and UV light of petite mutants in aerobically
and anaerobically cultivated *Saccharomyces cerevisiae*.
Mutation Res. 9, 193, (1970)
- Michaelis, G.; Douglass, S.; Ming-Jer Tsai; Criddle, R.S.:
Mitochondrial DNA and suppressiveness of petite mutants in
Saccharomyces cerevisiae. Biochem. Genetics 5, 487, (1971)
- Mitchell, I. de G.; Bevan, E.A.: Suppressors of "blue" mutations
in yeast. Genet. Res. Camb. 23, 37, (1974)
- Mounolou, J.C.; Jakob, H.; Slonimski, P.P.: Mitochondrial DNA
from yeast "petite" mutants. Specific changes of bouyant
density corresponding to different cytoplasmic mutants.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 218, (1966)

- Nagai, S.: Induction of respiration-deficient mutations in yeast by various synthetic dyes. *Science* 130, 1188, (1959)
- Nagley, P.; Linnane, A.W.: Mitochondrial DNA deficient petite mutants of yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39, 989, (1970)
- Nagley, P.; Linnane, A.W.: Studies on the nature of the mitochondrial genome in yeast: the degenerative effects of ethidium bromide on mitochondrial genetic information in a respiratory competent strain. *J. Mol. Biol.* 66, 181, (1972)
- Nordström, K.: Induction of the petite mutation in *Saccharomyces cerevisiae* by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *J. Gen. Microbiol.* 48, 277, (1967)
- Ogur, M.; Ogur, S.; St. John, R.: Temperature dependence of the spontaneous mutation rate to respiratory deficiency in *Saccharomyces*. *Genetics* 45, 189, (1960)
- Paoletti, J.; Le Pecq, J.B.: Resonance energy transfer between ethidium bromide molecules bound to nucleic acids. Does intercalation wind or unwind the DNA-helix? *J. Mol. Biol.* 59, 43, (1971)
- Perlman, P.S.; Mahler, H.R.: A premutational state induces in yeast by ethidium bromide. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 44, 261, (1971)
- Preer jr., J.R. : Extrachromosomal inheritance: hereditary symbionts, mitochondria and chloroplasts. *Ann. Rev. Genet.* 5, 361, (1971)
- Rauen, H.M.: *Biochemisches Taschenbuch*, H.M. Rauen ed., 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, (1964)

- Roodyn, D.B.; Wilkie, D.: The biogenesis of mitochondria.
Methuen & Co. LTD, London, (1968)
- Rowlands, R.T.; Turner, G.: Nuclear and extranuclear inheritance
of oligomycin resistance in *Aspergillus nidulans*.
Molec. gen. Genet. 126, 201, (1974)
- Saunders, G.W.; Gingold, E.B.; Trembath, M.K.; Lukins, H.B.;
Linnane, A.W.: Mitochondrial genetics in yeast: segregation
of a cytoplasmic determinant in crosses and its loss or
retention in the petite. In: Autonomy and biogenesis of
mitochondria and chloroplasts. N.K. Boardman, A.W. Linnane,
R.M. Smillie eds., 185, Amsterdam: North-Holland Publ.
(1971)
- Schatz, G.; Haslbrunner, E.; Tuppy, H.: Deoxyribonucleic acid
associated with yeast mitochondria. Biochem. Biophys. Res.
Commun. 15, 127, (1964)
- Schnepf, E.; Brown, R.H., jr.: On relationships between endo-
symbiosis and the origin of plastids and mitochondria. In:
Origin and continuity of cell organelles. J. Reinert und H.
Ursprung eds., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New
York, 299, (1971)
- Sherman, F.: The heat inactivation and production of cytochrome
deficiency in yeast. Exptl. Cell Res. 11, 659, (1956)
- Sherman, F.: Respiration deficient mutants of yeast. I. Genetics.
Genetics 48, 375, (1963)
- Slonimski, P.P.; Perrodin, G.; Croft, J.H.: Ethidium bromide
induced mutation of yeast mitochondria: complete transforma-
tion of cells into respiratory deficient non-chromosomal
"petites". Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 232, (1968)

- Storm, E.M.; Lam, K.B.; Marmur, J.: A non-mendelian temperature sensitive respiratory deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 77, Supplement, 62, (1974)
- Thomas, D.Y.; Wilkie, D.: Recombination of mitochondrial drug-resistance factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 30, 368, (1968)
- Visconti, N.; Delbrück, M.: The mechanism of genetic recombination in phage. *Genetics* 38, 5, (1953)
- Waldron, C.; Roberts, C.F.: Cytoplasmic inheritance of a cold-sensitive mutant in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 78, 379, (1973)
- Waring, M.J.: Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J. Mol. Biol.* 13, 269, (1965)
- Weislogel, P.O.; Butow, R.A.: Low temperature and chloramphenicol induction of respiratory deficiency in a cold-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 67, 52, (1970)
- Weislogel, P.O.; Butow, R.A.: Control of the mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 246, 5113, (1971)
- Wilkie, D.: The induction by monochromatic UV-light of respiratory deficient mutants in aerobic and anaerobic cultures of yeast. *J. Mol. Biol.* 7, 527, (1963)
- Wilkie, D.; Saunders, G.; Linnane, A.W.: Inhibition of respiratory enzyme synthesis in yeast by chloramphenicol: Relationship between chloramphenicol tolerance and resistance to other antibacterial antibiotics. *Genet. Res., Cam.* 10, 199, (1967)

- Williamson, D.H.: The effect of environmental and genetic factors on the replication of mitochondrial DNA in yeast. In: Control of organelle development. Symposia of the society for experimental biology XXIV, P. Miller ed., Cambridge: at the University Press, 247, (1970)
- Williamson, D.H.; Maroudas, N.G.; Wilkie, D.: Induction of the cytoplasmic petite mutation in *Saccharomyces cerevisiae* by the antibacterial antibiotics erythromycin and chloramphenicol. *Molec. Gen. Genetics* 111, 209, (1971)
- Wintersberger, E.: Proteinsynthese in isolierten Hefemitochondrien. *Biochem. Z.* 341, 409, (1965)
- Wolf, K.; Dujon, B.; Slonimski, P.P.: Mitochondrial genetics. V. Multifactorial mitochondrial crosses involving a mutation conferring paromomycin-resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molec. Gen. Genetics* 125, 53, (1973)

LEBENS LAUF

Geboren am 7. Juni 1946 in Klingenberg am Main, Kreis Obernburg

- | | |
|-------------|---|
| 1952 - 1956 | Volksschule in Würzburg |
| 1956 - 1965 | Gymnasium in Würzburg mit Abschluß Abitur |
| 1965 - 1970 | Studium der Fächer Biologie und Chemie in
Würzburg und München |
| 1970 | Staatsexamen in Biologie und Chemie für das
höhere Lehramt an den Gymnasien |
| 1971 | Beginn der Doktorarbeit am Genetischen Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München |
| 1974 | Beginn des Referendardienstes für das höhere
Lehramt an den Gymnasien |

